

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Dipartimento di Agraria



Dottorato in Food Science

XXXV Ciclo

“PON Dottorato Innovativo”

*Progettazione e sviluppo di genotipi di  
pomodoro con migliori caratteristiche  
nutrizionali*

**Tutor:**

Ch.ma Prof.ssa

Maria Manuela Rigano

**Candidata:**

Luigia Principio

**Coordinatore:**

Ch.ma Prof.ssa

Amalia Barone

*Amalia Barone*

2021-2022

# University of Naples “Federico II”

## Department of Agricultural Sciences



## Ph.D. in Food Science

## XXXV Cycle

## “PON Dottorato Innovativo”

# *Design and development of tomato genotypes with improved nutritional characteristics*

## Tutor:

Dr. Prof.

Maria Manuela Rigano

### **Candidate:**

## Luigia Principio

### **Coordinator:**

Dr Prof

Amalia Barone

Freddie Brose

2021-2022

Questo lavoro è stato finanziato dal Ministero dell'Istruzione dell'Università e della Ricerca e dall'Unione Europea nell'ambito del Programma Operativo Nazionale (PON) Ricerca e Innovazione 2014-2020 (CCI 2014IT16M2OP005), Fondo Sociale Europeo, Azione I.1 “Dottorati Innovativi con caratterizzazione Industriale”.



UNIONE EUROPEA  
Fondo Sociale Europeo



A mio nonno Antonio

## Abstract

The final aim of this thesis is the study of biosynthesis and the accumulation of ascorbic acid in tomato fruits and its bioavailability in by-products of the tomato supply chain.

Ascorbic Acid (vitamin C or AsA), has a powerful antioxidant activity in the human body, and is also involved in the protection of cellular components (DNA, proteins and lipids) from oxidative damage induced by free radicals (ROS, Reacting Oxygen Species) which are formed as a result of metabolic processes. The human body is not able to synthesize this vitamin, which being water-soluble is eliminated every day. It is therefore very important to take this antioxidant regularly through the diet.

Tomato fruits (*Solanum lycopersicum* L.) are one of the main sources of antioxidants of vegetable origin. Many studies have associated their consumption with a reduced risk of cancer, inflammation and cardiovascular disease. These effects are attributed to the presence of antioxidant molecules including AsA. The growing interest in wellness is influencing consumer choices by directing them to eat functional foods with high antioxidant potential. Most tomatoes are consumed fresh or are the basic ingredient of a wide variety of cooked and processed foods such as juices, sauces and soups. Hence the need to find new ways to obtain functional processed products and genotypes of biofortified tomatoes with enhanced levels of antioxidants, without neglecting the agronomic and economic aspects.

Modern cultivars have a low concentration of antioxidants compared to wild species, being the result of several cycles of domestication and breeding activities that have allowed to improve the tomato from an agronomic point of view, in particular for its yield and its adaptation, while neglecting the organoleptic and nutraceutical qualities of the fruit.

Today it is possible to use new genetic resources, including introgression lines (IL), to increase the antioxidants content in tomato and study the mechanisms behind their production. These introgression lines contain a homozygous segment of the wild genome in the background of the cultivated variety and represent a genomic library very useful to identify the genes involved in the regulation of

quantitative trait loci (QTL). Worldwide, researchers have focused mainly on the wild species *Solanum pennellii*, obtaining a population of 76 introgression lines. In our laboratory at the Department of Agriculture, University of Naples Federico II, seven sublines (genotypes encoded from R176 to R182) of the IL 7-3 that carried reduced portions of the wild genome compared to IL7-3 on the same chromosome and showing high levels of antioxidants and °Brix in fruits. In particular, the subline R182 showed qualitative characteristics of the fruits significantly higher than the cultivated genotype M82, showing however comparable levels of yield, thus exceeding the low yield always found in the parental line IL7-3.

In this thesis paper we performed a characterization of the subline R182 and other 3 sublines (R176, R178 and R181) coming from the same cross in order to identify superior lines for content of antioxidant molecules, in particular AsA. Based on genome analysis previously performed by our laboratory and the results obtained from the characterization performed in this thesis, the R182 subline was chosen to identify the candidate genes controlling the content of ascorbic acid in fruits. CRISPR/Cas9 was then used to validate genes identified in R182 subline. Finally, as the consumption of processed tomato products has increased in recent years, the effects of the industrial transformation process on the content of ascorbic acid and other antioxidant molecules have also been assessed.

The first objective of this thesis was to make a characterization of the sublines of the *S. pennellii* IL7-3, carriers of QTL positive for the accumulation of AsA in tomato fruit. Two separate studies were conducted, one in open field and one in a controlled environment. The results of the biometric, qualitative and metabolomic analyses of the two experiments confirmed the better performance of R182 subline compared with the cultivated genotype M82. In addition, the genotype R182 showed higher °Brix and greater ascorbic acid accumulation in the fruits than M82. These data were well in agreement with the increased accumulation of glucose and fructose, precursors of the biosynthesis pathway of the Smirnoff-Wheeler AsA, highlighted in R182.

The second objective of this thesis was to identify the candidate genes responsible for the accumulation of ascorbic acid through the CRISPR/Cas9 genome editing technique. Among all the genes mapped in the introgression region of R182, attention was focused on two coding genes for a *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT) and a *Major Facilitator Superfamily Protein* (MFSP), which could play an indirect role in the biosynthesis and accumulation of AsA and in the control of other key quality traits including the °Brix. In the T<sub>1</sub> generation of plants obtained by genetic transformation, qualitative and metabolomic analyses were carried out. These preliminary results allowed us to affirm the effective involvement of the candidate genes NAT and MSFP in the transport and accumulation of ascorbic acid in fruits.

The third objective of this thesis was to evaluate the effects of the industrial processing on the content of the main nutraceutical compounds. To obtain a functional and quality food, qualitative analyses were carried out on five by-products obtained with different processing techniques. The results of the analysis showed that in processed products, lipophilic and hydrophilic antioxidant activity, total phenols and vitamin C content decrease due to heat treatments. Thus, fresh tomatoes continue to be the preferred source of ascorbic acid and other antioxidant compounds beneficial to human health.

In conclusion, the results obtained in this thesis, have allowed to confirm the better performance of subline R182 compared to genotype M82 excluding the environmental factor. Therefore, in the future it could be used in a breeding program to improve the nutritional characteristics of tomato fruit. In addition, the results obtained from the genetic transformation with the CRISPR/Cas9 technique allowed to identify the function of the MFSP gene present in the introgression region of the R182 subline and of the NAT gene located downstream of the introgressed region. Finally, analyses conducted on the processed products demonstrated the influence of thermal processes on the content of antioxidant compounds.

## Abstract

Scopo finale della presente tesi è lo studio della biosintesi e l'accumulo dell'acido ascorbico nei frutti di pomodoro e la sua biodisponibilità nei sottoprodotti della filiera del pomodoro.

L'acido ascorbico (vitamina C o AsA), ha una potente attività antiossidante nel corpo umano, ed è implicato anche nella protezione dei componenti cellulari (DNA, proteine e lipidi) dai danni ossidativi indotti dai radicali liberi (ROS, *Reacting Oxygen Species*) che si formano a seguito di processi metabolici. Il corpo umano non è in grado di sintetizzare questa vitamina, che essendo idrosolubile viene eliminata tutti i giorni. È quindi molto importante assumere questo antiossidante regolarmente tramite l'alimentazione.

Le bacche di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) sono una delle principali fonti di antiossidanti di origine vegetale. Molti studi hanno associato il loro consumo a un ridotto rischio di cancro, infiammazione e malattie cardiovascolari. Questi effetti sono attribuiti alla presenza di molecole antiossidanti tra cui l'acido ascorbico. Il crescente interesse per il benessere sta influenzando le scelte dei consumatori indirizzandoli a mangiare cibi funzionali ad alto potenziale antiossidante. La maggior parte dei pomodori viene consumata fresca o costituisce l'ingrediente base di un'ampia varietà di cibi cotti e trasformati come succhi, salse e zuppe. Da qui nasce l'esigenza di trovare nuovi modi per ottenere prodotti trasformati funzionali e genotipi di pomodoro biofortificati con livelli potenziati di antiossidanti, senza trascurare gli aspetti agronomici ed economici.

Le cultivar moderne presentano una concentrazione bassa di antiossidanti rispetto alle specie selvatiche, essendo il risultato di diversi cicli di domesticazione e di attività di *breeding* che hanno permesso di migliorare il pomodoro da un punto di vista agronomico, in particolare per la sua resa e il suo adattamento, trascurando però le qualità organolettiche e nutraceutiche del frutto.

Oggi è possibile utilizzare nuove risorse genetiche, tra cui le linee d'introgressione (IL), per aumentare il contenuto di antiossidanti in pomodoro e studiare i meccanismi alla base della loro produzione. Queste linee d'introgressione contengono un segmento omozigote del genoma selvatico nel background della varietà coltivata e rappresentano una libreria genomica molto utile per identificare

i geni coinvolti nella regolazione dei *Quantitative Trait Loci* (QTL). A livello mondiale, i ricercatori si sono concentrati soprattutto sulla specie selvatica *Solanum pennellii*, ottenendo una popolazione di 76 linee d'introgressione. Nel nostro laboratorio presso il Dipartimento di Agraria dell'Università di Napoli Federico II, sono state identificate sette sublinee (genotipi codificati da R176 a R182) della IL 7-3 che portavano porzioni ridotte del genoma selvatico rispetto a IL7-3 sullo stesso cromosoma e che mostravano alti livelli di antiossidanti e °Brix nei frutti. In particolare, la sublinea R182 ha mostrato caratteristiche qualitative dei frutti significativamente superiori al genotipo coltivato M82, mostrando però livelli di resa paragonabili, superando così la bassa resa sempre riscontrata nella linea parentale IL7-3.

In questo elaborato di tesi è stata eseguita una caratterizzazione della sublinea R182 e di altre 3 sublinee (R176, R178 e R181) provenienti dallo stesso incrocio al fine di identificare linee superiori per contenuto di molecole antiossidanti, in particolare di acido ascorbico. Sulla base di analisi del genoma precedentemente eseguiti dal nostro laboratorio e dai risultati ottenuti dalla caratterizzazione eseguita in questa tesi, la sublinea R182 è stata scelta per identificare i geni candidati che controllano il contenuto di acido ascorbico nei frutti. La tecnica CRISPR/Cas9 è stata quindi utilizzata per validare i geni identificati nella sublinea R182. Infine, poiché negli ultimi anni sta aumentando il consumo di prodotti trasformati a base di pomodoro, sono stati valutati anche gli effetti del processo di trasformazione industriale sul contenuto di acido ascorbico e altre molecole antiossidanti.

Il primo obiettivo della presente tesi è stato quello di effettuare una caratterizzazione delle sublinee di *S. pennellii* IL7-3, portatrici di QTL positivi per l'accumulo di AsA nel frutto del pomodoro. Sono state condotte due prove sperimentali, una in pieno campo e una in ambiente controllato. I risultati delle analisi biometriche, qualitative e metabolomiche dei due esperimenti hanno confermato le migliori prestazioni della sublinea R182 rispetto al genotipo coltivato M82. Inoltre, il genotipo R182 ha mostrato maggiori °Brix e un maggior accumulo di acido ascorbico nel frutto rispetto a M82. Questi dati ben si accordavano con il

maggior accumulo di glucosio e fruttosio, precursori della via di biosintesi dell'AsA di Smirnoff-Wheeler, evidenziati in R182.

Il secondo obiettivo della presente tesi è stato quello di identificare i geni candidati responsabili dell'accumulo di acido ascorbico tramite la tecnica di *genome editing* CRISPR/Cas9. Tra tutti i geni mappati nella regione di introgressione di R182, è stata focalizzata l'attenzione su due geni codificanti per un *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT) e per una *Major Facilitator Superfamily Protein* (MFSP), che potrebbero svolgere un ruolo indiretto nella biosintesi e nell'accumulo di AsA e nel controllo di altri tratti qualitativi chiave tra cui °Brix. Nella generazione T<sub>1</sub> delle piante ottenute dalla trasformazione genetica, sono state eseguite delle analisi qualitative e metabolomiche. Questi risultati preliminari ci hanno permesso di affermare l'effettivo coinvolgimento dei geni candidati NAT e MSFP nel trasporto e accumulo dell'acido ascorbico in bacca.

Il terzo obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare gli effetti del processo di trasformazione industriale sul contenuto dei principali composti nutraceutici. Per ottenere un alimento funzionale e di qualità sono state eseguite analisi qualitative su cinque sottoprodotti ottenuti con diverse tecniche di trasformazione. I risultati delle analisi hanno dimostrato che nei prodotti trasformati l'attività antiossidante lipofila e idrofila, il contenuto totale di fenoli e della vitamina C diminuiscono a causa dei trattamenti termici. Quindi il pomodoro fresco continua a rappresentare la fonte preferibile di acido ascorbico e altri composti antiossidanti benefici alla salute umana.

In conclusione, i risultati ottenuti nella presente tesi hanno permesso di confermare le migliori prestazioni della sublinea R182 rispetto al genotipo M82 escludendo il fattore ambiente. Quindi in futuro potrebbe essere utilizzata in un programma di *breeding* per migliorare le caratteristiche nutrizionali del frutto del pomodoro. Inoltre, i risultati ottenuti dalla trasformazione genetica con la tecnica CRISPR/Cas9 hanno permesso di identificare la funzione del gene MFSP presente nella regione d'introgressione della sublinea R182 e del gene NAT localizzato a

valle della regione intogressa. Infine, le analisi condotte sui prodotti trasformati hanno dimostrato l'influenza dei processi termici sul contenuto dei composti antiossidanti.

# Indice

1	Introduzione generale.....	1
1.1	Il pomodoro ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	2
1.2	Acido ascorbico: produzione e accumulo in pomodoro .....	4
1.3	Biofortificazione.....	8
1.3.1	Le linee d'introgressione.....	8
1.3.2	Il <i>genome editing</i> .....	14
1.4	Effetti del processo di trasformazione sulla composizione chimica del pomodoro .....	20
1.5	Scopo della tesi.....	22
2	Caratterizzazione di sublinee di <i>S. pennellii</i> in <i>S. lycopersicum</i> .....	23
2.1	Materiale e metodi.....	24
2.1.1	Materiale vegetale .....	24
2.1.2	Condizioni sperimentali .....	24
2.1.3	Analisi qualitative del frutto.....	25
2.1.4	Determinazione del contenuto di acido ascorbico .....	26
2.1.5	Determinazione del contenuto di fenoli totali.....	27
2.1.6	Determinazione del contenuto di carotenoidi e tocoferoli .....	28
2.1.7	Metaboliti primari .....	29
2.1.8	Analisi statistica .....	30
2.2	Risultati.....	31
2.2.1	Analisi della sublinea R182 allevata in pieno campo .....	31
2.2.2	Analisi biochimiche e metabolomiche .....	33
3	La tecnica CRISPR/Cas9 per identificare i geni candidati responsabili dell'accumulo di acido ascorbico.....	40
3.1	Materiali e metodi.....	41

3.1.1	Materiale vegetale .....	41
3.1.2	Disegno <i>single guide</i> RNA (sgRNA) e clonaggio .....	41
3.1.3	Trasformazione di <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	43
3.1.4	Trasformazione genetica mediante <i>A. tumefaciens</i> .....	44
3.1.5	<i>Screening</i> delle piante T <sub>0</sub> trasformate .....	46
3.1.6	<i>Screening</i> della generazione T <sub>1</sub> .....	48
3.1.7	Analisi del contenuto di solidi solubili.....	48
3.1.8	Determinazione del contenuto di acido ascorbico .....	49
3.1.9	Determinazione del contenuto di carotenoidi e tocoferoli .....	49
3.1.10	Metaboliti primari .....	50
3.1.11	Analisi statistica .....	51
3.2	Risultati.....	52
3.2.1	Prova di rigenerazione.....	52
3.2.2	Genotipizzazione delle piante T <sub>0</sub> .....	53
3.2.3	Genotipizzazione della generazione T <sub>1</sub> .....	55
3.2.4	Analisi qualitative .....	58
4	Caratterizzazione dei sottoprodotti della filiera del pomodoro.....	66
4.1	Materiali e metodi.....	67
4.1.1	Processo di lavorazione dei sottoprodotti del pomodoro .....	67
4.1.2	Tratti qualitativi.....	69
4.1.2.1	Determinazione del contenuto totale dei carotenoidi, licopene e β-carotene.....	70
4.1.2.2	Determinazione del contenuto di fenoli totale .....	70
4.1.2.3	Attività antiossidante.....	71
4.1.2.4	Determinazione del contenuto di acido ascorbico .....	71
4.1.3	Analisi statistica .....	72

4.2	Risultati.....	73
4.2.1	Analisi chimico fisiche.....	73
4.2.2	Antiossidanti e composti bioattivi.....	74
5	Discussioni .....	78
6	Conclusioni .....	88
7	Bibliografia .....	91
8	Materiale supplementare .....	116

# 1 Introduzione generale

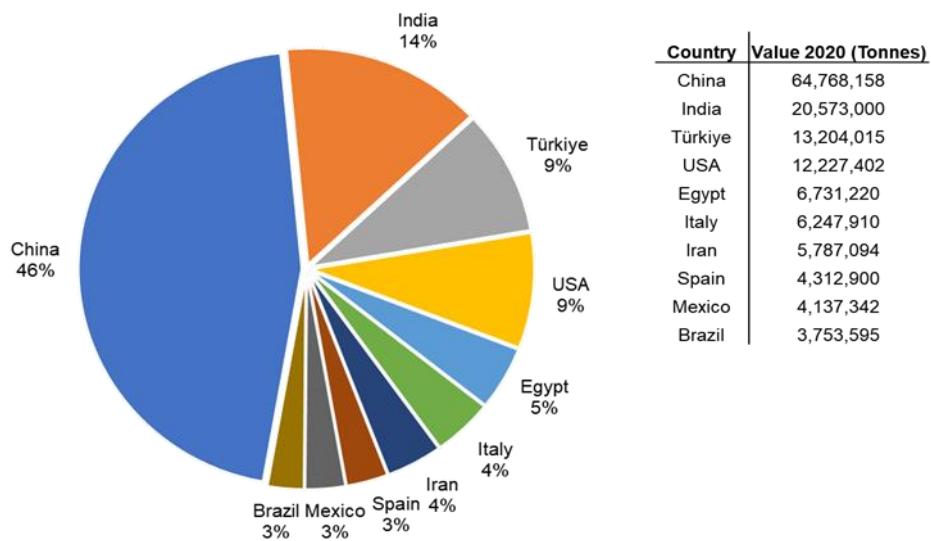
---

## 1.1 Il pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.)

Il pomodoro è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Solanaceae, una delle più importanti e grandi famiglie di piante, raggruppate nel genere *Solanum*. Questa famiglia comprende 98 generi e più di 2700 specie (Yadav et al., 2016) con un elevato impatto economico e utilizzate quotidianamente nell'alimentazione umana. Ad esempio, tra gli alimenti sono inclusi il pomodoro, la patata (*Solanum tuberosum* L.) e la melanzana (*Solanum melongena* L.), tra i medicinali la belladonna (*Atropa belladonna* L.), il giusquiamo (*Hyoscyamus niger* L.) e altre specie comuni come il tabacco e la petunia, utilizzate a scopo ornamentale (Knapp & Peralta, 2016; Olmstead & Bohs, 2007).

Il pomodoro coltivato (*Solanum lycopersicum* L.) è uno dei principali componenti della dieta mediterranea e l'ortaggio più consumato al mondo grazie alla sua versatilità. La maggior parte dei pomodori viene consumata fresca o è l'ingrediente base di un'ampia varietà di alimenti cotti e trasformati, come succhi, salse e zuppe.

Tra i primi venti paesi produttori di pomodoro al mondo, l'Italia è al sesto posto con 6247910 tonnellate di pomodori prodotti nel 2020. Il principale paese produttore di pomodoro è la Cina, con 64768158 tonnellate di pomodori prodotti. In India, secondo paese al mondo per produzione, la quantità prodotta è più del triplo dell'Italia: 20573000 tonnellate. Seguono paesi produttori minori, come la Turchia, gli Stati Uniti d'America, l'Egitto, l'Italia, l'Iran, la Spagna, il Messico, il Brasile, la Nigeria, la Russia, l'Ucraina, l'Uzbekistan, l'Algeria, la Tunisia, il Portogallo, il Marocco, il Camerun e l'Indonesia (Figura 1.1) (FAOSTAT, 2022).



**Figura 1.1.** I 20 principali paesi produttori di pomodoro nel 2020 (FAOSTAT, 2022).

Oltre al loro ruolo di importanti fonti alimentari, molte specie di Solanaceae hanno anche un ruolo di piante modello per la biologia vegetale in quanto hanno subito relativamente pochi riarrangiamenti e duplicazioni del genoma e quindi hanno un contenuto e un ordine genico molto simile (Mueller et al., 2005).

Il pomodoro (Figura 1.2), tra tutte le specie di Solanaceae, è una delle dicotiledoni coltivate meglio studiate a livello molecolare ed è stato utilizzato come specie modello per la ricerca genetica e genomica, grazie al suo genoma diploide con 12 coppie di cromosomi e un genoma di dimensioni relativamente ridotte (950 Mbp) (Michaelson et al., 1991), che codifica circa 35.000 geni. Inoltre, ha tempi di generazione brevi, tecnologie di trasformazione efficienti e numerose risorse genetiche e genomiche già disponibili (Barone et al., 2008). Oltre alla specie coltivata (*Solanum lycopersicum* L.), esistono altre specie selvatiche affini, tra cui *Solanum arcanum*, *Solanum cheesmaniae*, *Solanum corneliomulleri*, *Solanum galapagense*, *Solanum huaylasense*, *Solanum pimpinellifolium*, *Solanum chmielewskii*, *Solanum chilense*, *Solanum neorickii*, *Solanum peruvianum*, *Solanum habrochaites*, e *Solanum pennellii* (Ercolano et al., 2021; Peralta et al., 2005; Peralta & Spooner, 2000).

Il processo di domesticazione e la selezione delle varietà commerciali, a cui si è aggiunto negli anni il miglioramento genetico, hanno permesso di ottenere genotipi con un'elevata resa e un aumento delle dimensioni della bacca di pomodoro. Di

conseguenza si è ridotto la variabilità genetica con un'influenza negativa sulle proprietà nutraceutiche, sulla qualità commerciale e organolettica del frutto (Bertin & Génard, 2018). Oggi per migliorare le varietà coltivate e recuperare la variabilità genetica si stanno utilizzando le specie selvatiche. Attraverso incroci interspecifici tra il pomodoro coltivato e le specie selvatiche, si sono ottenute le linee d'introgressione (IL) (Eshed & Zamir, 1995). Queste linee rappresentano potenti risorse genetiche utili per studiare i meccanismi molecolari e a rilevare alleli selvatici favorevoli per il miglioramento genetico del pomodoro coltivato.



**Figura 1.2.** Differenza in forma, dimensione e colore della bacca di pomodoro.

## 1.2 Acido ascorbico: produzione e accumulo in pomodoro

Il pomodoro è un'importante fonte di antiossidanti e, in particolare, di acido ascorbico (AsA), noto anche come vitamina C o acido L-ascorbico. L'AsA è uno dei più importanti composti antiossidanti per le piante e anche per l'uomo che non è in grado di sintetizzarlo. Infatti, l'ascorbato di origine vegetale è la principale fonte di vitamina C nella dieta umana.

Molti studi hanno confermato che queste molecole antiossidanti sono associate a un ridotto rischio di cancro, infiammazione e malattie cardiovascolari (Francesca et al., 2020). Nella pianta, l'acido ascorbico funge da cofattore per molti enzimi e

da regolatore della divisione e della crescita cellulare, nonché nella trasduzione del segnale (Gallie, 2013).

La biosintesi di AsA nelle piante superiori è stata identificata di recente (Wheeler et al., 1998) e avviene nei mitocondri attraverso diverse vie identificate (Akram et al., 2017) (Figura 1.3). Il pathway biosintetico più frequentemente osservato per la sintesi della vitamina C coinvolge forme attivate degli zuccheri GDP-D-mannosio, GDP-L-galattosio and L-galattosio ed infine il composto L-galactono-1,4-lattone che è convertito a L-acido ascorbico (Valpuesta & Botella, 2004; Wheeler et al., 1998; Wolucka et al., 2005).

La via principale identificata è quella del D-mannosio/L-galattosio (Wheeler et al., 1998). In questa via, il D-glucosio viene convertito in D-glucosio-6-fosfato dall'enzima esochinasi. Il D-glucosio-6-fosfato formato viene poi convertito in GDP-D-mannosio attraverso un processo reversibile in quattro fasi catalizzato dagli enzimi fosfogluco-isomerasi, mannosio 6-fosfato isomerasi, fosfomannosio mutasi e GDP-D-mannosio fosforilasi, rispettivamente (Akram et al., 2017). La seconda fase principale prevede la conversione del GDP-D-mannosio in GDP-L-galattosio in seguito a tre reazioni catalizzate successivamente dagli enzimi GDP-D-mannosio 3',5'-epimerasi, GDP-L-galattosio fosforilasi e L-galattosio 1-P fosfatasi. Il GDP-L-galattosio viene successivamente convertito in L-galattosio dall'azione dell'enzima L-galattosio deidrogenasi e infine in L-galattone-1, 4-lattone, precursore finale dell'AsA. Infine, l'acido ascorbico si forma dal L-galattone-1,4-lattone in una reazione enzimatica catalizzata dalla L-galattone-1,4-lattone deidrogenasi (Akram et al., 2017).

La seconda via identificata prevede la degradazione delle pectine della parete cellulare, che porta alla formazione di metil-galatturonato che viene convertito in L-galattonato attraverso due reazioni catalizzate dalla pectin metil esterasi e dalla D-galatturonato reduttasi. In seguito, l'enzima aldono-lattonasi catalizza la conversione dell'L-galattonato in L-galattone-1, 4-lattone e viene infine utilizzato nella sintesi dell'ascorbato (Smirnoff et al., 2001).

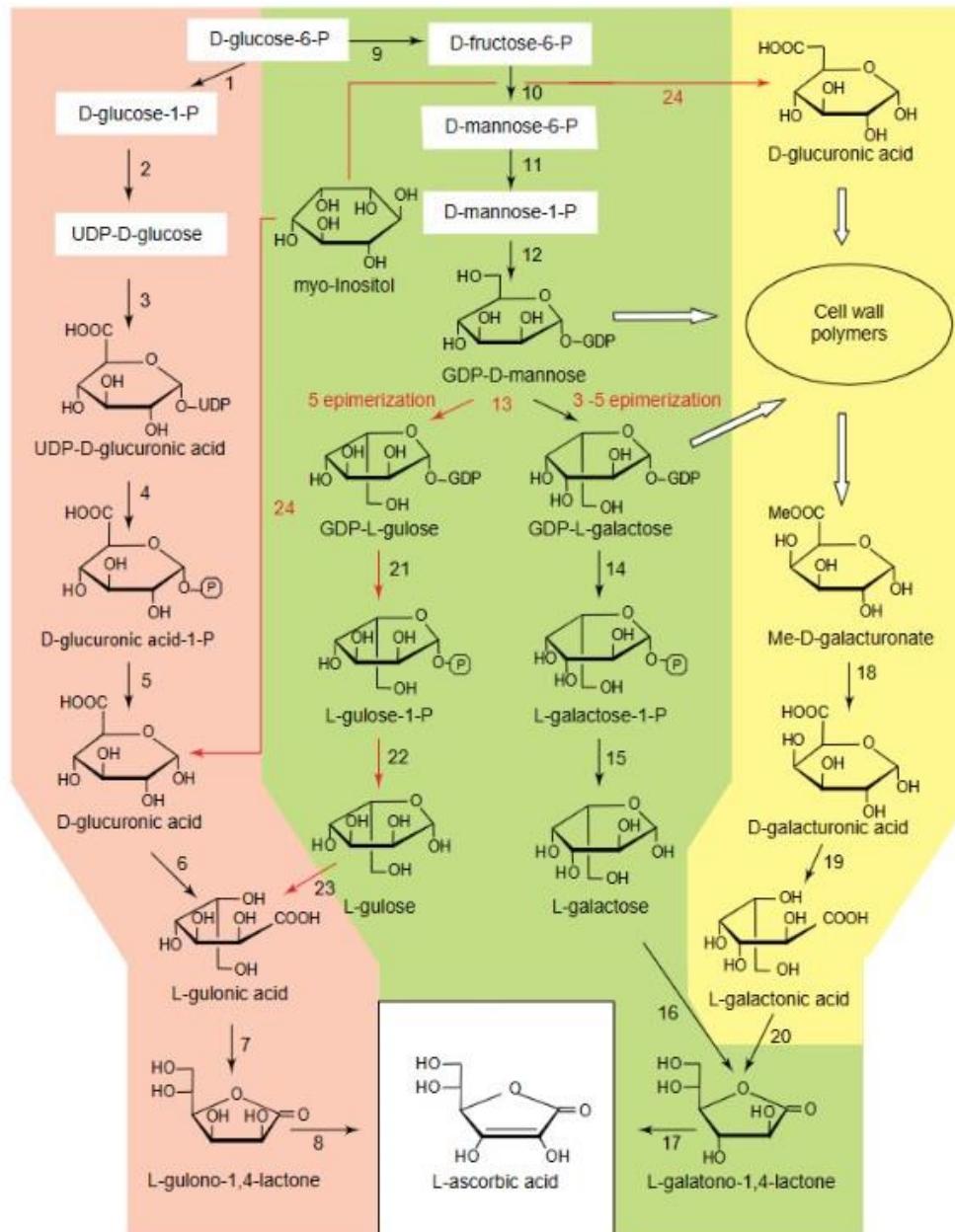
La terza via prevede la conversione del GDP-D-mannosio in GDP-L-gulosio e la successiva formazione di L-gulono-1, 4-lattone tramite L-gulosio (Wolucka & Montagu, 2003). Si tratta di una via simile a quella primaria che parte dal glucosio,

ma questa via si dirama dal GDP-D-mannosio. Da qui, il GDP-D-mannosio viene convertito in L-gulosio in tre reazioni catalizzate rispettivamente da GDP-D-mannosio-3', 5'-epimerasi, GDP-L-gulosio-1-P-fosfatasi e L-gulosio-1-P-fosfatasi. A questo punto, l'enzima L-gulono-1, 4-lattone deidrogenasi catalizza la conversione di L-gulosio in L-gulono-1, 4-lattone, che viene infine convertito in AsA (Smirnoff et al., 2001).

In una quarta via, l'ascorbato è sintetizzato a partire dal mioinositolo. In breve, il mioinositolo viene convertito in L-gulono-1, 4-lattone attraverso tre reazioni catalizzate da una mioinositolo ossigenasi, una glucuronato reduttasi e una aldono-lattone (Valpuesta & Botella, 2004). Il gulono-1, 4-lattone viene infine utilizzato nella sintesi dell'ascorbato (Smirnoff et al., 2001).

La *European food safety authority* raccomanda un fabbisogno medio (AR) di 90 mg di vitamina C al giorno per gli uomini e di 80 mg per le donne (EFSA, 2022). Come scritto in precedenza, l'uomo non è in grado di sintetizzare la vitamina C e deve incorporarla con la dieta.

Abushita et al. (2000) hanno riportato un contenuto di vitamina C compreso tra 15 e 21 mg/100 g FW nei pomodori da insalata coltivati in campo e un valore medio di 19 mg/100 g FW nei pomodori da industria. Ruggieri et al. (2016) hanno invece registrato valori di AsA compresi tra 10 e 40 mg/100 g di FW nelle varietà commerciali. Data l'importanza dell'acido ascorbico e il vasto utilizzo del pomodoro nella dieta mediterranea è molto importante migliorare le qualità nutrizionali del frutto e quindi procedere con la sua biofortificazione con l'utilizzo delle più moderne tecniche di *genome editing*.



**Figura 1.3.** Vie biosintetiche alternative dell'AsA nelle piante. Vie biosintetiche proposte negli animali (reazioni 1-8) e nelle piante (reazioni 9-24). Le frecce rosse indicano le attività enzimatiche delle nuove vie che portano alla biosintesi di vitamina C. Gli enzimi che catalizzano le reazioni sono: 1, fosfoglucomutasi; 2, UDP-glucosio pirofosforilasi; 3, UDP-glucosio deidrogenasi; 4, glucuronato-1-fosfato uridiletrasferasi; 5, glucuronato chinasi; 6, glucuronato reduttasi; 7, aldonolattonasi; 8, gulono-1,4-lattone deidrogenasi; 9, glucosio-6-fosfato isomerasi; 10, mannosio-6-fosfato isomerasi; 11, fosfomannomutasi 12, GDP-mannosio pirofosforilasi (mannosio-1-fosfato guanilitransferasi); 13, GDP-mannosio-3',5'-epimerasi; 14, fosfodiesterasi; 15, zucchero fosfatas; 16, L-galattosio deidrogenasi; 17, L-galattono-1,4-lattone deidrogenasi; 18, metilesterasi; 19, D-galatturonato reduttasi; 20, aldono-lattonasi; 21, fosfodiesterasi; 22, zucchero fosfatas; 23, L-gulosio deidrogenasi; 24, mioinositol ossigenasi (Valpuesta & Botella, 2004).

## 1.3 Biofortificazione

Negli ultimi anni, la biofortificazione delle colture ha dato un enorme contributo alla comprensione del rapporto tra dieta e salute.

Molti prodotti alimentari non solo forniscono le calorie e i nutrienti necessari al corpo umano, ma anche molti benefici per la salute (Singh et al., 2016). Il pomodoro è uno di questi alimenti il cui ruolo protettivo per l'uomo contro varie malattie degenerative è noto in tutto il mondo. Questa azione protettiva è attribuita a componenti antiossidanti come carotenoidi, fenoli e vitamine (tra cui l'acido ascorbico), nonché alle interazioni sinergiche tra di essi (H. Li et al., 2013; Maiani et al., 2009; Martínez-Valverde et al., 2002; Raiola et al., 2014). Questi costituenti bioattivi hanno attività antiossidanti, antinfiammatorie e riducono il rischio di cancro e malattie cardiovascolari (Feng et al., 2010; Polívková et al., 2010; Rafi et al., 2007; Scolastici et al., 2007, 2008). Molti studi recenti hanno indagato il ruolo degli antiossidanti e hanno confermato che possono anche contrastare gli effetti nocivi delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Halliwell & Cross, 1994; Rao & Rao, 2007). I ROS possono essere generati dalla normale attività metabolica e da fattori legati allo stile di vita e sono la causa di diverse malattie croniche.

Questi risultati hanno spinto molti ricercatori a trovare nuovi modi per ottenere genotipi di pomodoro biofortificati con livelli potenziati di fitonutrienti come per esempio l'acido ascorbico.

Come descritto di seguito, i tentativi di creare nuove linee di pomodoro con geni per l'accumulo di nutrienti possono essere realizzati sfruttando le linee d'introgressione e le nuove tecniche di *editing* come la tecnica CRISPR/Cas9.

### 1.3.1 Le linee d'introgressione

Le varietà di pomodoro commerciali utilizzate oggi sono il risultato di diversi cicli di domesticazione e di intense attività di *breeding*, motivo per cui alcuni tratti agronomicamente importanti sono andati persi (Blanca et al., 2015). Questi eventi di domesticazione da un lato hanno permesso di selezionare il pomodoro per la sua resa e il suo adattamento, dall'altro questa attività di selezione ha portato all'erosione della variabilità genetica e quindi alla perdita di fonti di variabilità. La

diversità genetica può essere recuperata dalle specie selvatiche (Víquez-Zamora et al., 2013). La variabilità genetica presente dei parentali selvatici è una potenziale fonte di alleli benefici inutilizzati, che il processo di domesticazione e il lavoro di miglioramento genetico degli anni passati hanno progressivamente eliminato (Li et al., 2018). Quindi le specie selvatiche di *Solanum* sono utili come fonte per il miglioramento del pomodoro (Bradeen, 2021) in particolare per la qualità dei frutti.

La variabilità genetica di alcune di queste specie selvatiche è stata sfruttata per ottenere linee di introgressione (IL) che rappresentano uno strumento molto utile per identificare i geni coinvolti nella regolazione dei *quantitative trait loci* (QTL), agevolando così l'identificazione di alleli selvatici favorevoli che controllano i caratteri agronomicamente interessanti.

Le linee di introgressione, un insieme di linee quasi isogeniche sviluppate attraverso una successione di reincroci (Lippman et al., 2007), contengono un segmento cromosomico omozigote del genoma selvatico, definito da marcatori molecolari, nel background genetico della varietà coltivata e, nel loro insieme, rappresentano una libreria genomica della specie selvatica (Eshed & Zamir, 1994). Queste popolazioni IL sono state ottenute da diverse specie di pomodoro selvatico, come *Solanum pennellii*, *Solanum lycopersicoides* (Canady et al., 2005) *Solanum habrochaites*, *Solanum neorickii*, *Solanum pimpinellifolium* (Fridman et al., 2004), *Solanum sitiens* (Pertuzé et al., 2003), *Solanum peruvianum* (Yates et al., 2004), *Solanum chmielewskii* (Frary et al., 2003) and *Solanum cheesmaniae* (Robert et al., 2001).

Molti studi si sono concentrati su *S. pennellii*, una specie selvatica del Sud America, considerata un importante donatore di germoplasma per il pomodoro coltivato (Bolger et al., 2014). La piccola specie a frutto verde del deserto *Solanum pennellii* è un lontano parente di *S. lycopersicum* che, in risposta all'habitat desertico, ha sviluppato adattamenti unici in termini di morfologia, sistema di accoppiamento, chimica e stress biotico/abiotico. Nonostante queste specificità, è sessualmente compatibile e produce ibridi fertili con *S. lycopersicum*. Per questi motivi è stato scelto come genitore donatore da cui ha avuto origine la prima popolazione di linee di introgressione (Alseekh et al., 2013; Lippman et al., 2007).

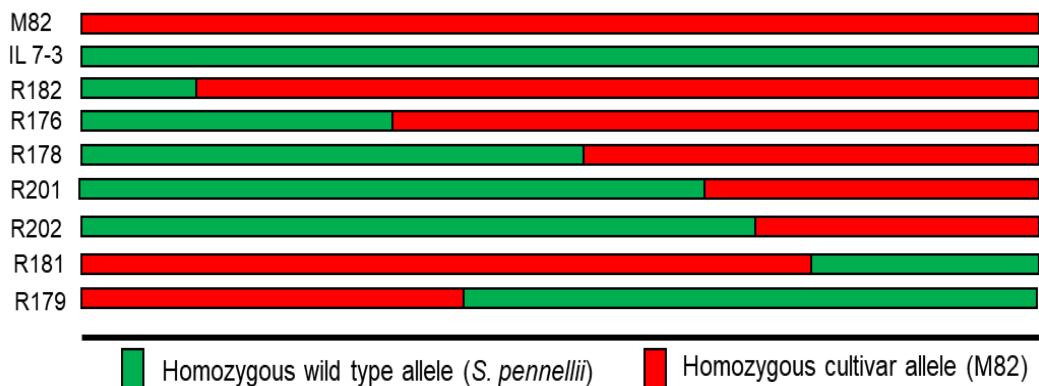
La popolazione IL di *S. pennellii*, disponibile pubblicamente dal 1995, comprende attualmente un nucleo di 76 linee di introgressione. Le linee d'introgressione di *S. pennellii* sono state ottenute incrociando *S. pennellii* con la varietà coltivata di *S. lycopersicum* M82 (Eshed & Zamir, 1995), in cui i segmenti genomici definiti del genoma di *S. pennellii* hanno sostituito le regioni omologhe nel background di *S. lycopersicum* (cultivar M82) (Caruso et al., 2016). Di conseguenza, questa popolazione di IL è la più sfruttata per studi genetici e molecolari (Causse et al., 2004). È stata utilizzata per identificare un certo numero (più di 3000) di QTL che influenzano la morfologia, la tolleranza agli stress, la resa delle piante, il colore dei frutti e il metabolismo (Alseekh et al., 2013; Krause et al., 2018; Lippman et al., 2007), poiché qualsiasi differenza fenotipica tra una linea di introgressione e la linea parentale ricorrente è attribuita esclusivamente ai geni all'interno del segmento cromosomico introgresso (Lippman et al., 2007).

Negli ultimi anni, in molti laboratori queste linee di introgressione di *S. pennellii* sono state utilizzate per identificare i geni e gli alleli che controllano la produzione e l'accumulo di antiossidanti nei frutti di pomodoro e per produrre materiale genetico superiore con quantità maggiori di molecole antiossidanti (Gürbüz Çolak et al., 2020) tra cui la vitamina E (Almeida et al., 2011; Quadrana et al., 2014), la vitamina C (Calafiore et al., 2016; Di Matteo et al., 2010; Rigano et al., 2014; Sacco et al., 2013; Stevens et al., 2007), i carotenoidi (Calafiore et al., 2016), i flavonoidi e gli acidi fenolici (Alseekh et al., 2015, 2017; Di Matteo et al., 2013; Minutolo et al., 2013; Rigano et al., 2014; Rousseaux et al., 2005; Sacco et al., 2013), e aumentare l'attività antiossidante totale (Rigano et al., 2014; Rousseaux et al., 2005).

Il problema principale nell'analisi dei QTL è la mancanza di una sufficiente risoluzione di mappatura, nonostante gli studi di associazione *genome-wide* (GWAS) e l'adozione della genotipizzazione, tramite sequenziamento. Una possibile soluzione a questa mancanza di risoluzione è stato il *backcross* delle 76 IL di *S. pennellii* oggi disponibili con il genotipo *S. lycopersicum* cv. M82 per generare sublinee e definire meglio i fattori genetici alla base dei caratteri di interesse. Attualmente sono state ottenute 285 sublinee di *S. pennellii* con piccoli frammenti introgressi dal genitore donatore. Per definire meglio le regioni

introgresso in queste sublinee sono stati utilizzati marcatori come ad esempio i Conserved Ortholog Set II (COSII), i Simple Sequence Repeats (SSR) e altri marcatori (Alseekh et al., 2013).

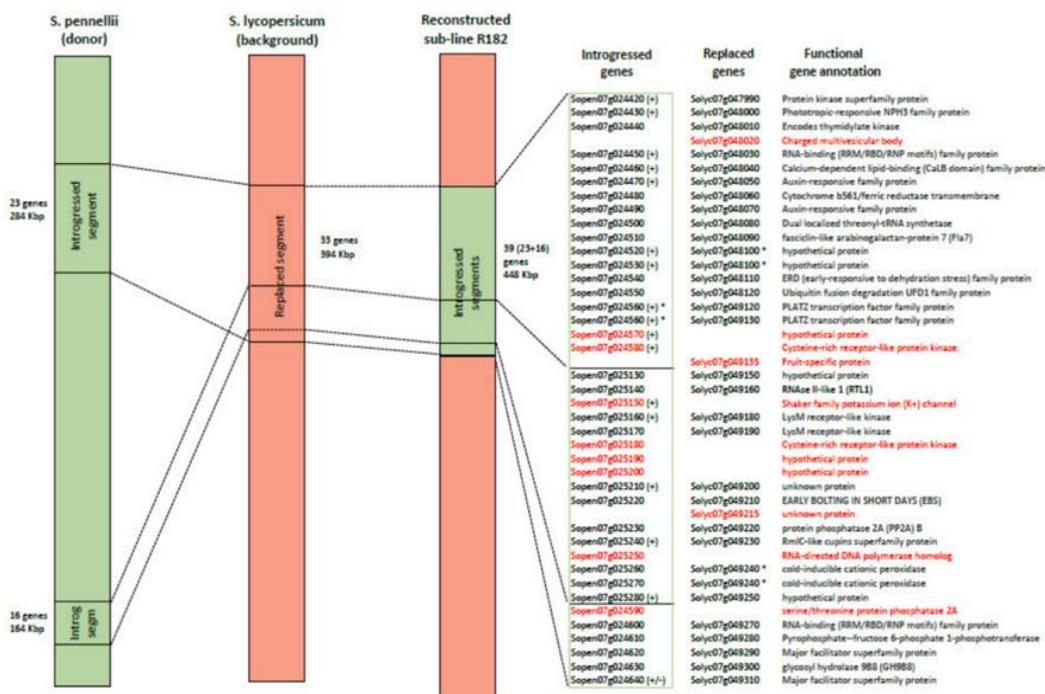
Recentemente, presso il nostro laboratorio di genomica strutturale e funzionale del Dipartimento di Agraria dell'Università di Napoli Federico II, abbiamo identificato sette sublinee (genotipi codificati da R176 a R182) della IL di *S. pennellii* (IL 7-3) che portavano porzioni ridotte del genoma selvatico rispetto a IL7-3 sullo stesso cromosoma e che mostravano diversi livelli di antiossidanti e °Brix nei frutti (Figura 1.4). In particolare una sublinea (codificata R182) ha mostrato caratteristiche qualitative dei frutti significativamente superiori rispetto al genotipo M82 in diversi campi sperimentali e in anni diversi (Calafiore et al., 2016). La sublinea R182 ha sempre mostrato un livello di resa paragonabile a quello di M82, superando così di gran lunga la bassa resa sempre riscontrata nella linea parentale IL7-3.



**Figura 1.4.** Dimensione e identità genomica delle sette sublinee della linea d'introgressione 7-3 di *S. pennellii* (Calafiore et al., 2016).

Un gruppo di marcatori molecolari specie-specifici è stato utilizzato su R182 e sui genotipi parentali per definire meglio le regioni genomiche selvatiche presenti nella sublinea R182. In Aliberti et al. (2020) mediante un'analisi di RNA-Seq e con l'uso di otto marcati specifici, gli autori sono riusciti a ricostruire la regione introgressa di R182 e hanno dimostrato che 39 geni selvatici avevano sostituito 33 geni di *S. lycopersicum* cv. M82 (Figura 1.5). In particolare, gli autori hanno scoperto che un frammento di 394 Kbp comprendente 33 geni

*S. lycopersicum* (da *Solyc07g047990* a *Solyc07g049310*) è stato sostituito da due segmenti di 284 Kbp e 164 Kbp di cui 23 (da *Sopen07g024420* a *Sopen07g024640*) e 16 (da *Sopen07g025130* a *Sopen07g025280*) geni *S. pennellii*, rispettivamente. Un ulteriore confronto tra le linee parentali ha dimostrato una traslocazione del secondo segmento selvatico (comprendente 16 geni), che era incorporato nella prima regione con 23 geni selvatici (Aliberti et al., 2020).



**Figura 1.5.** Ricostruzione della regione selvatica introgressa in R182 mediante analisi sintenica della porzione genomica del cromosoma 7 tra *S. pennellii* e *S. lycopersicum* (Aliberti et al., 2020).

Tra tutti i geni mappati nella regione introgressa di R182, in Aliberti et al. (2020) gli autori hanno focalizzato la loro attenzione sul gene *Solyc07g049310/Sopen07g024640*. Questo gene, che codifica per una proteina di membrana *Major Facilitator Superfamily* (MFS), era già stato proposto come gene candidato (Calafiore et al., 2019) che potrebbe svolgere un ruolo indiretto nella biosintesi e nell'accumulo di AsA, modulando la quantità di precursori di AsA. Infatti, la MFS sono proteine coinvolte nell'importazione o nell'esportazione di zuccheri che sono precursori della biosintesi dell'acido ascorbico (Reuscher et al., 2014). Le analisi di RNA-Seq hanno confermato che il gene MFS è sovraespresso in R182. Inoltre, gli autori dello stesso lavoro hanno anche evidenziato che questo

gene, che si trova a valle della regione d'introgressione, ha una sequenza chimerica che combina le caratteristiche geniche dell'allele *S. pennellii* con la restante 3'UTR di *S. lycopersicum* (Figura 1.6). Questo cambiamento/ricombinazione della 3'UTR potrebbe essere responsabile dell'alterato livello di espressione del gene *Solyc07g049310* (Srivastava et al., 2018).



**Figura 1.6.** Multi-allineamento dell'ultimo esone di *Sopen07g024640*, dell'ortologo *Solyc07g049310* e della sequenza ricombinata in R182. L'evento di ricombinazione si è verificato tra il rettangolo verde che mostra l'ultima variante di *S. pennellii* del gene R182 e i rettangoli rossi che mostrano le varianti di *S. lycopersicum* del gene R182. La freccia blu indica la posizione in cui inizia la 3' *Untranslated Region* (UTR) (Aliberti et al., 2020).

In un lavoro precedente (Calafiore et al., 2016), gli autori hanno inoltre evidenziato la presenza a valle della regione introgressa di R182 del gene *Solyc07g049320* che codifica per una *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT),

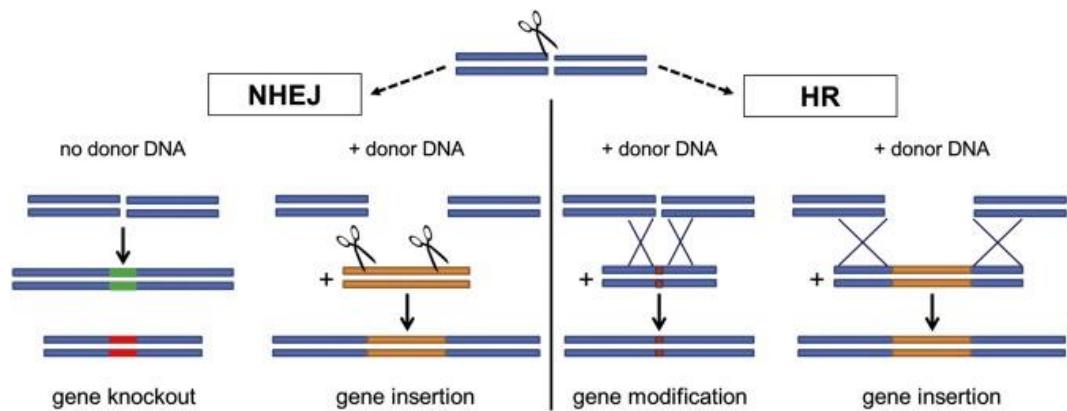
presumibilmente coinvolto nell'accumulo di AsA perché potrebbe avere un ruolo nel trasporto di AsA tra i diversi compartimenti intracellulari (Calafiore et al., 2016).

La funzione e i meccanismi d'azione di questi geni sono stati validati in questa tesi di dottorato attraverso approcci genomici funzionali utilizzando la tecnica CRISPR/Cas9 per produrre mutanti *knock-out* in collaborazione con il Centro Ricerche Metapontum Agrobios – Agenzia Lucana per lo Sviluppo e l’Innovazione in Agricoltura (ALSIA).

### **1.3.2 Il *genome editing***

Negli ultimi anni si è visto un incredibile sviluppo delle tecnologie volte allo studio di geni di interesse e al miglioramento genetico delle piante. I metodi di miglioramento genetico classico si basano su ibridazioni, su incroci intra- e interspecifici. Questi strumenti risultano però essere di difficile replicazione; essi, inoltre, causano riarrangiamenti cromosomici e mutazioni indesiderate (Ma et al., 2016). Un ausilio alle tecniche di miglioramento genetico classico è dato dai marcatori molecolari. I marcatori molecolari identificano variazioni della sequenza nucleotidica (polimorfismo del DNA) presenti in un genoma. La posizione dei marcatori sui cromosomi è nota e questo permette di utilizzarli come punto di riferimento per stabilire la posizione dei geni lungo i cromosomi. Ciò permette la costruzione di mappe molecolari che offrono la possibilità di individuare marcatori molecolari strettamente associati ai geni di interesse permettendo di seguire la segregazione dei geni stessi (Lorenzetti et al., 2018). L'ingegneria genetica differisce dai precedenti approcci perché si basa su tecniche di manipolazione genomica e non più sulla selezione dei caratteri ereditabili; inoltre, si compone di diverse tecniche, tra cui il *genome editing* con il quale è possibile inserire, rimuovere e modificare il DNA nel genoma degli organismi viventi. Questa manipolazione permette di modificare in modo specifico il genoma delle piante e si esplica attraverso l'uso di nucleasi sequenza-specifiche (*sequence specific nucleases*, SSNs), cioè “forbici” molecolari capaci di effettuare rotture su entrambi i filamenti di DNA (DSBs) nel punto di interesse del genoma (W. Chen et al., 2014; Podevin et al., 2013). Le DSBs vengono sottoposte all'attività di meccanismi di

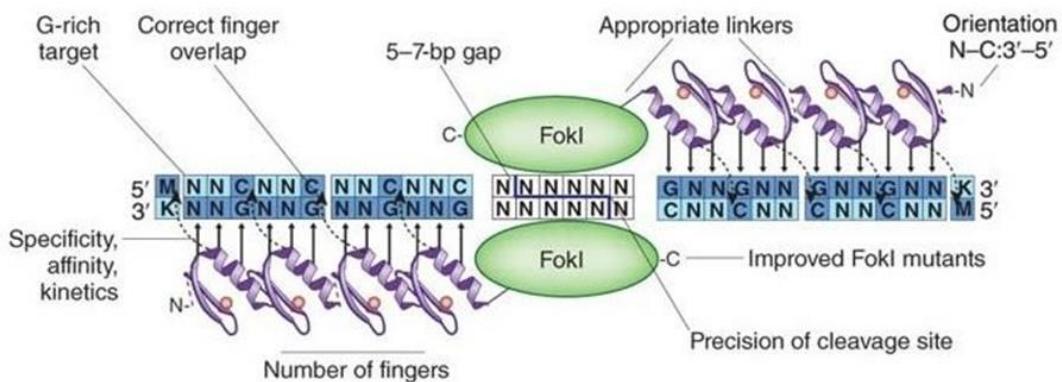
riparo cellulari naturali, che possono intervenire in modi diversi. I due principali sistemi di riparazione del DNA possono intervenire per giunzione di estremità non omologhe (*non-homologous end-joining*, NHEJ) oppure mediante ricombinazione omologa (*homology-directed repair*, HR) (Ye et al., 2018) (Figura 1.7). L’NHEJ è un meccanismo molto rapido ed efficiente, ma impreciso, nel quale il filamento leso viene ricongiunto nel punto di taglio, ma alcuni nucleotidi possono essere erroneamente inseriti o escisi e, nel caso in cui la rottura del DNA avvenga in una regione codificante, la riparazione può determinare una mutazione di quel gene, causando *knock-out* genico (Bortesi & Fischer, 2015). L’HR, invece, è un meccanismo differente, utilizza il cromatidio fratello come stampo per la riparazione del DNA leso. Nello specifico, un complesso proteico costituito da diversi fattori individua la rottura, i due filamenti danneggiati di DNA vengono divisi e appaiati sulle sequenze omologhe del cromatidio fratello, le quali fungeranno da stampo per la riparazione.



**Figura 1.7.** Meccanismo di riparazione nell’*editing* del genoma usando due diversi approcci: NHEJ, (*non-homologous end-joining*) e HR (*homology-directed repair*) (Bortesi & Fischer, 2015).

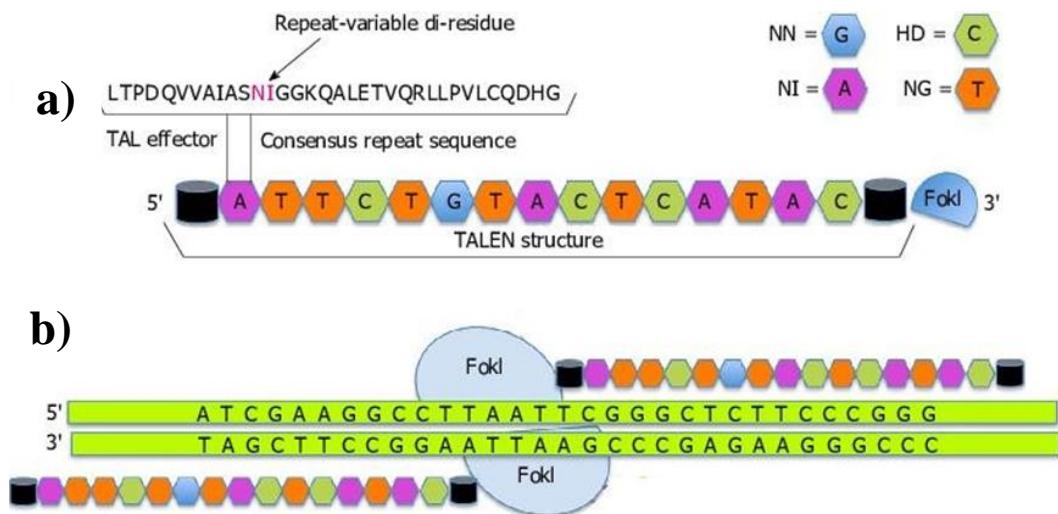
Fino al 2013, gli strumenti di modifica del genoma erano le nucleasi Zinc (ZFNs) e *Transcription activator-like effector* (TALEN). Le prime SSN ad essere utilizzate per strategie di *editing* genetico sono state le nucleasi a dita di zinco (ZFN) (Bibikova et al., 2003), questi sono enzimi di restrizione costituiti da due elementi fondamentali: il dominio di legame al DNA ed il dominio di scissione del DNA (Figura 1.8). Il primo dominio è costituito da 3-6 motivi a dita di zinco ognuno dei quali è in grado di riconoscere una sequenza di 3 bp. Il secondo è rappresentato da

una endonucleasi chiamata FokI, proveniente da *Flavobacterium okeanokoites*, che riconosce una sequenza non palindroma e taglia dalle 9 alle 13 bp a valle della sequenza target. FokI per poter svolgere la sua funzione deve dimerizzare, quindi sono necessari due monomeri ZFNs affinché venga prodotta una rottura sulla doppia elica del DNA, al quale seguono i processi di riparazione HR o HNEJ; quest'ultimo, più frequente negli organismi vegetali, può portare alla manifestazione di fenomeni di silenziamento genico (*gene knock-out*) (Petolino, 2015). Successivamente al DSB è possibile introdurre DNA esogeno.



**Figura 1.8.** Meccanismo di riconoscimento delle ZFN (Isalan, 2012).

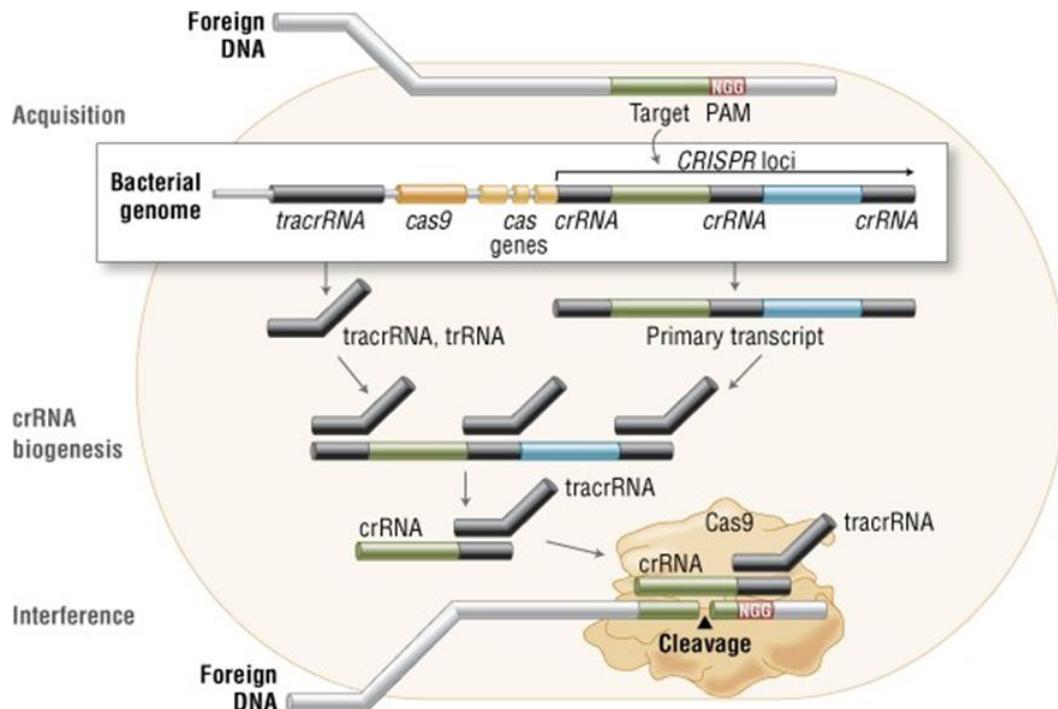
A causa della difficoltà di costruzione e all'elevato costo, le ZFN sono state sostituite in poco tempo dalle TALEN (Boch et al., 2009) anch'esse costituite da due domini proteici. Il primo è il dominio di legame al DNA e deriva da patogeni del genere *Xanthomonas* capaci di rilasciare nell'ospite la proteina TALE, la quale attiva l'espressione di geni che promuovono l'infezione batterica. La TALE è costituita da un monomero di 33-35 aminoacidi ripetuto dalle 13 alle 28 volte; di fatto, la sequenza amminoacidica è molto conservata ad eccezione dei residui amminoacidici 12 e 13 chiamati RVDs (*repeat variable di-residues*) necessari per il riconoscimento specifico del DNA. Il secondo dominio è rappresentato dalla endonucleasi FokI che dimerizzando (Figura 1.9) provocano la rottura della doppia elica. Sebbene le TALEN risultino più facili nell'utilizzo rispetto alle ZFN, la disponibilità limitata di siti target nel genoma, la percentuale di *off-target* elevata ed i costi eccessivi ne hanno limitato l'utilizzo nel tempo, soprattutto a seguito dell'avvento del CRISPR/Cas9.



**Figura 1.9.** a) Struttura TALEN, in dettaglio la descrizione di RVD; b) Meccanismo di riconoscimento e taglio di TALEN (Raikwar et al., 2016).

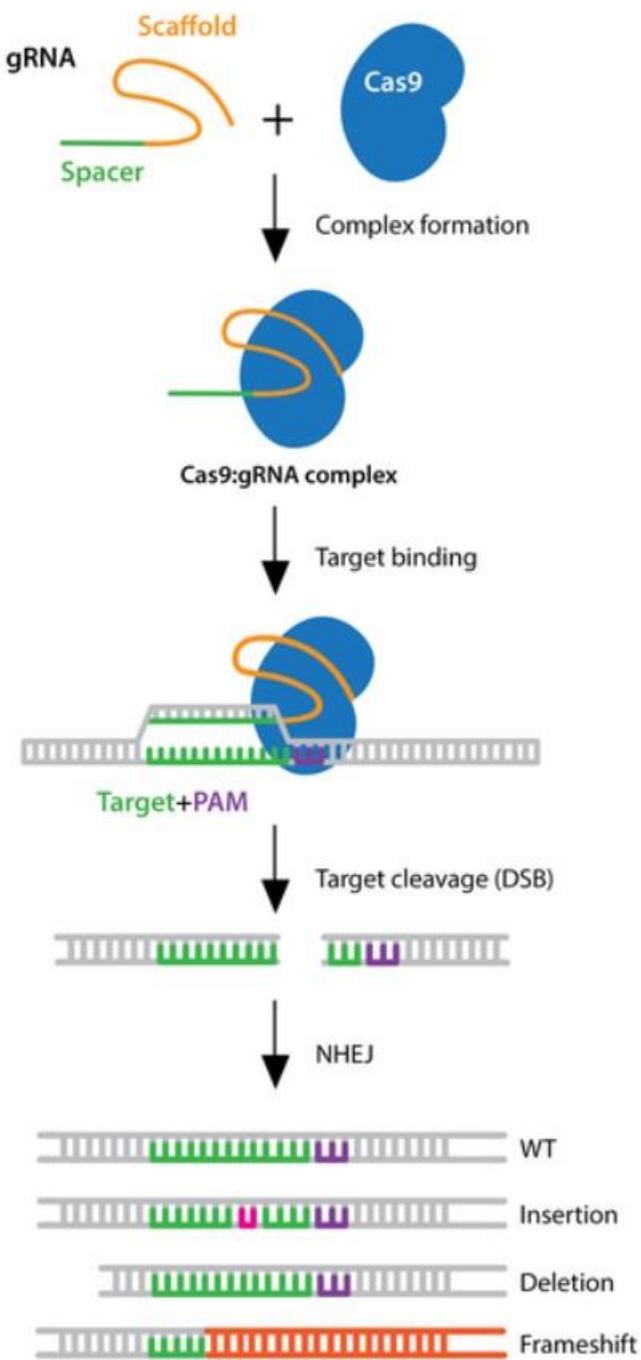
Il sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) con la proteina associata Cas9 (*CRISPR Associated Protein*) è definito come una sorta di sistema immunitario batterico.

Tale sistema è stato ingegnerizzato a partire dal sistema CRISPR di tipo II dal batterio *Streptococcus pyogenes* (Jinek et al., 2012). Il sistema immunitario dei batteri, a seguito dell'esposizione di elementi genetici invasivi di batteriofagi o plasmidi, è capace di integrare piccoli frammenti del DNA esogeno nel proprio genoma (Figura 1.10). Se il batterio viene attaccato una seconda volta dallo stesso endoparassita, questi frammenti verranno utilizzati per riconoscere dei siti specifici del genoma dell'invasore, definiti PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), per poi poterlo distruggere (Barrangou, 2015). Nel dettaglio, nella prima fase definita adattativa, il DNA esogeno entra nel batterio, i suoi frammenti vengono integrati all'interno delle sequenze CRISPR del genoma dell'ospite sottoforma di *spacer*. La fase successiva è quella di formare l'RNA guida capace di riconoscere il genoma invasore: numerosi precursori a RNA (pre-crRNA) vengono trascritti dal modulo CRISPR e successivamente tagliati dalle proteine Cas per ottenere frammenti di crRNA (Wiedenheft et al., 2012).



**Figura 1.10.** Meccanismo CRISPR/Cas9 di tipo II in batterio (<https://international.neb.com>).

Il crRNA subisce un processo di maturazione strutturale che legando un *trans activating* crRNA (tracrRNA) va a formare una struttura secondaria a forcina. Questa struttura (tracrRNA + crRNA) unendosi con la Cas9, si dirigerà verso il riconoscimento ed il taglio del DNA esogeno (Barrangou, 2015; Jiang & Doudna, 2017). A differenza dei sistemi I e III che richiedono la formazione di un ampio complesso di proteine Cas per processare il DNA esogeno, il vantaggio di utilizzare un sistema CRISPR di tipo II è che è necessaria una sola proteina Cas, detta Cas9. Per l'utilizzo di questo sistema nell'ingegneria genetica, è stato costruito un singolo RNA guida chimerico (sgRNA), complementare ad una specifica sequenza target di DNA, che assieme all'attività endonucleasica della Cas9 va ad effettuare un DSBs (Wu et al., 2014). L'estremità 5' del sgRNA contiene una sequenza di 19 nucleotidi detta “spacer”, che è complementare alla sequenza target del DNA, mentre al 3' è presente la sequenza “scaffold” che legando la proteina Cas9 formerà il complesso Cas9/sgRNA (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Formazione del complesso Cas9:sgRNA, riconoscimento della sequenza target e rottura del doppio filamento (<https://www.addgene.org>).

Quando lo *spacer* si appaia alla sequenza target, i domini RuvC ed HNH della Cas9 tagliano entrambi i filamenti di DNA, approssimativamente tre nucleotidi a monte della sequenza PAM (Ma et al., 2016). Il dominio RuvC taglia il filamento non complementare, mentre il dominio HNH taglia il filamento di DNA

complementare allo *spacer*. La rottura del doppio filamento risultante viene solitamente riparata dal meccanismo di ricombinazione di estremità non omologhe, a meno che non sia presente una sequenza donatrice omologa, causando mutazioni nel sito target (Jinek et al., 2012; Liu et al., 2017).

Per aumentare l'efficienza di *editing* sono stati costruiti diversi vettori a seconda dell'organismo da editare (Liang et al., 2014). Nelle piante, l'espressione del sgRNA è regolata da promotori U3 od U6, mentre l'espressione della Cas9 è regolata da promotori costitutivi come l'ubiquitina o CaMV 35S (*Cauliflower Mosaic Virus*). Un esempio recente in patata è stato descritto da Johansen et al. (2019). Mediante l'utilizzo di promotori endogeni *StU6*, gli autori hanno ottenuto in colture di protoplasti mutazioni in tutti e quattro gli alleli del gene codificante l'amido sintetasi legata al granulo (GBSS). Non sono state individuate mutazioni che divergessero anche di un'unica bp dalla sequenza guida utilizzata.

Un aspetto fondamentale da tenere presente è che per i metodi di trasformazione genetica delle piante ed anche per il *genome editing* risultano essere fondamentali le tecniche di colture *in vitro* di cellule, di tessuti e di organi della pianta. Questo perché saranno proprio le porzioni di pianta da allevare *in vitro* (espianti) ad essere editate e da tali espianti potrà poi essere rigenerata l'intera pianta che porti in maniera stabile le nuove caratteristiche volute e sia in grado di trasferirle alle progenie.

## 1.4 Effetti del processo di trasformazione sulla composizione chimica del pomodoro

Il pomodoro, come descritto precedentemente, ha molti effetti benefici sulla salute umana ma i composti bioattivi devono essere bioaccessibili prima di raggiungere i tessuti bersaglio dopo la digestione gastrointestinale. Diversi fattori, come i metodi di lavorazione e conservazione, sono in grado di influenzare questi composti. La biodisponibilità dei composti nutraceutici del pomodoro non è generalmente influenzata dai comuni metodi di cottura casalinghi, il che lo rende ancora più vantaggioso per il consumo umano (Graziani et al., 2003; Sánchez-Moreno et al., 2006). Oggi il consumo di pomodoro è ulteriormente aumentato

grazie allo sviluppo di molti prodotti trasformati come zuppe, succhi, passate e salse. È stato stimato che circa il 75% dei pomodori viene consumato in forma trasformata. Di questi pomodori trasformati, il 35% è consumato come salse, il 18% come concentrato di pomodoro, il 17% come pomodori in scatola, il 15% come succhi e il 15% come ketchup (Raiola et al., 2014).

I prodotti trasformati possono mostrare una composizione molto diversa rispetto al prodotto fresco. Ad esempio, durante il periodo di conservazione post-raccolta e durante la preparazione e la cottura degli alimenti possono verificarsi perdite significative di acido ascorbico. Ciò è dovuto all'ossidazione e alla lisciviazione nell'acqua utilizzata per la cottura. Inoltre, per ottenere questi prodotti trasformati sono necessari diversi trattamenti termici e/o l'omogeneizzazione che possono alterare la matrice cellulare dei pomodori, determinando la biodisponibilità di diversi nutrienti. Per esempio Dewanto et al. (2002), Gahler et al. (2003) hanno osservato una perdita di vitamina C nei pomodori trattati termicamente a 88 °C. Mentre, dopo il trattamento termico a 88 °C per 2, 15 e 30 minuti, l'attività antiossidante totale è aumentata significativamente. Questo effetto potrebbe essere spiegato dalla maggiore quantità di licopene, il principale fitochimico nei pomodori. Seybold et al. (2004) hanno studiato il contenuto carotenoidi e vitamina E in campioni di salsa di pomodoro, zuppa di pomodoro, fette di pomodoro al forno e succo di pomodoro presi in diversi momenti di riscaldamento. La quantità di  $\beta$ -carotene è diminuita o è rimasta stabile mentre il contenuto di  $\alpha$ -tocoferolo è aumentato significativamente durante il riscaldamento a breve termine.

Nel complesso, queste evidenze potrebbero avere un impatto significativo sulla selezione degli alimenti da parte dei consumatori, aumentando la loro consapevolezza dei benefici per la salute dei pomodori trasformati nella prevenzione delle malattie croniche e dell'infiammazione.

Nel presente lavoro sono stati analizzati diversi sottoprodotti del pomodoro al fine di valutare come il processo di trasformazione influenzi il contenuto di carotenoidi, fenoli e vitamina C. In tal modo sarà possibile ottimizzare tale processo evitando quindi la perdita di questi principali composti nutraceutici.

## 1.5 Scopo della tesi

Le line d'introgressione di *S. pennellii* e le loro sublinee già disponibili, costituiscono un interessante materiale genetico per raggiungere nuovi risultati nella selezione di genotipi superiori e per identificare geni candidati per aumentare l'accumulo di acido ascorbico nel frutto maturo del pomodoro. L'obiettivo principale della presente tesi è quello di aumentare le conoscenze relative all'accumulo di questo metabolita nel frutto sfruttando le varie risorse genetiche e genomiche oggi disponibili per la specie pomodoro.

In particolare, gli obiettivi specifici della presente tesi sono:

1. Caratterizzazione delle sublinee di *S. pennellii* IL7-3, portatrici di QTL positivi per l'accumulo di acido ascorbico (AsA) nel frutto del pomodoro;
2. Caratterizzazione genotipica e fenotipica di mutanti *knock-out* ottenuti con la tecnica di *genome editing* CRISPR/Cas9 per identificare i geni candidati responsabili dell'accumulo di acido ascorbico (AsA) nei frutti di pomodoro;
3. Valutazione degli effetti del processo di trasformazione industriale sul contenuto dei principali composti nutraceutici.

## 2 Caratterizzazione di sublinee di *S. pennellii* in *S. lycopersicum*

---

## 2.1 Materiale e metodi

### 2.1.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato nella presente ricerca include quattro sublinee di pomodoro prodotte tramite reincrocio tra la linea di introgressione di *Solanum pennellii* IL 7-3 e la specie coltivata *Solanum lycopersicum*, cultivar M82 (Calafiore et al., 2016): R176, R178, R181 e R182. A queste è stato aggiunto il controllo M82. Il Tomato Genetics Resource Center (TGRC) ha gentilmente fornito i semi (<http://tgrc.ucdavis.edu/>) di M82. Le sublinee sono state gentilmente fornite dal Dr. Dani Zamir (Hebrew University, Israele).

### 2.1.2 Condizioni sperimentali

Con i suddetti genotipi sono state condotte due prove sperimentali in ambiente controllato e in pieno campo. La germinazione dei semi di tutti i genotipi è stata effettuata al buio, in piastre Petri contenenti uno strato di carta Whatman 3MM-CHR (Whatman, Brentford, UK) inumidita. Alla comparsa della prima radichetta, le plantule sono state trasferite in terriccio, disposto in contenitori alveolari di polistirolo (con alveoli di 5 cm di diametro), ed allevate in camera di crescita per tre settimane.

Per la prova in ambiente controllato le piante alla fine della terza settimana sono state trasferite in vasi di plastica (11 cm di diametro, 9 cm di altezza) con substrato commerciale ed allevate in ambiente controllato nelle serre dell'Università di Napoli "Federico II" situate a Portici (Napoli, Italia) ad una temperatura costante di 24 °C, fotoperiodo di 16 h di luce e di 8 h di buio ad un'intensità luminosa di  $140 \cdot 106 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Per ogni genotipo (M82, R176, R178, R181 e R182) sono state allevate 10 piante con un disegno completamente randomizzato.

La seconda prova sperimentale è stata condotta in pieno campo nella stagione colturale 2020 in un campo sperimentale a Benevento (Campania) utilizzando solo i genotipi M82 e R182. Sono state allevate 10 piante per replica con 3 repliche biologiche per entrambi i genotipi, seguendo le tradizionali pratiche agronomiche della zona.

Per entrambe le prove sperimentali condotte i frutti di pomodoro sono stati raccolti allo stadio di rosso maturo (MR). Successivamente, i semi sono stati rimossi e i frutti sono stati macinati in azoto liquido con un frullatore (FRI150, Fimar) fino a ottenere una polvere fine e conservati a -80 °C per le successive analisi.

Per la prova sperimentale condotta in pieno campo, alla fine del ciclo colturale, è stata condotta un'analisi dei principali indici biometrici. È stata misurata l'altezza della pianta (cm), peso fresco della biomassa (g) e produttività (kg/pt) di 6 piante per i genotipi M82 e R182 nelle tre repliche biologiche.

### **2.1.3 Analisi qualitative del frutto**

Per ogni genotipo e replica biologica, sono stati raccolti frutti allo stadio rosso maturo per valutare il contenuto di solidi solubili, l'acidità titolabile, la consistenza della polpa del frutto e il colore.

*Contenuto solidi solubili.* Una goccia di succo del campione è stata utilizzata per la determinazione del contenuto di solidi solubili (°Brix), che è stata effettuata tramite rifrattometro portatile digitale HI 96801 Hanna Instruments, uno strumento che utilizza la misura dell'indice di rifrazione per determinare il contenuto zuccherino (°Brix). Per ogni genotipo è stata considerata una media di 10 misurazioni.

*Acidità titolabile.* Tale saggio esprime la quantità di acidi liberi e salificati nella soluzione in analisi, è stata determinata secondo il metodo standard ISO 750:1998 (E), che prevede il prelievo di un volume noto di succo cellulare (5 g) ai quali vengono aggiunti 60 mL di acqua demineralizzata. Servendosi di una buretta per titolazione. Sono stati quindi annotati il numero di mL di soluzione NaOH 0,1 N che sono serviti a raggiungere il valore soglia di pH 8 della soluzione composta dal campione più NaOH. Quindi si è definita l'acidità titolabile in grammi di acido citrico per 100 mg di prodotto fresco.

*Consistenza del frutto e colore.* La consistenza è stata misurata utilizzando un penetrometro PCE\_PTR200 con un ago di superficie di 8 mm. Le misurazioni del colore sono state eseguite sulla superficie dei pomodori, intorno alla regione equatoriale. È stato utilizzato un analizzatore di colore tristimolo Konica Minolta

modello CR-400a (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Giappone), costituito da una testa con un'area di misurazione di 8 mm di diametro e un'illuminazione diffusa/0° di visione. Il colorimetro è stato prima calibrato con una piastrella bianca e controllato per ricalibrarlo tra una misurazione e l'altra. Le letture sono riportate nel sistema L\*, a\*, b\*.

Il colore dei frutti maturi è stato valutato utilizzando le coordinate dello spazio di colore L\*, il valore del grado di luminosità, a\* e b\*, ossia una misura del grado di rossore o di verde e del grado di giallo o di blu, rispettivamente. Da questi parametri si possono calcolare, per caratterizzare la tridimensionalità dei colori, l'indicatore di sviluppo del colore (a\*/b\*), l'indice di maturazione  $((a^*)^2/(b^*)^2)$  e il valore Chroma  $((a^*)^2+(b^*)^2)^{0.5}$ , una misura della saturazione del colore.

## 2.1.4 Determinazione del contenuto di acido ascorbico

L'acido ascorbico (AsA) è stato misurato usando il metodo colorimetrico descritto da Stevens et al. (2006) con alcune modifiche riportate da Rigano et al. (2014). Il saggio è basato sulla riduzione del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  per mezzo dell'AsA e sul rilevamento spettrofotometrico del  $\text{Fe}^{2+}$  complessato con il 2,2'-dipiridile.

A 500 mg di campione congelato a -80 °C e ridotto in polvere sono stati aggiunti 300  $\mu\text{l}$  di acido tricloroacetico (TCA) al 6% freddo in una Eppendorf da 2 ml. I campioni sono stati vortexati per 10 secondi e lasciati in ghiaccio per 15 minuti. Sono stati, quindi, centrifugati a 14000 rpm per 20 minuti a 4 °C.

Due differenti saggi sono stati eseguiti per la determinazione, rispettivamente, dell'AsA totale e dell'AsA ridotto.

*Acido ascorbico ridotto.* 20  $\mu\text{l}$  di surnatante di ogni campione sono stati trasferiti in un tubo Eppendorf da 1,5 ml con 20  $\mu\text{l}$  di *buffer* fosfato 0,4 M (pH 7,4) e 10  $\mu\text{l}$  di acqua MilliQ. Poi sono stati aggiunti 80  $\mu\text{l}$  di soluzione di reazione colorante (CR). Questa soluzione è stata preparata unendo la soluzione A [31% (w/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (acido fosforico), 4,6% (w/v) TCA e 0,6% (w/v)  $\text{FeCl}_3$  (cloruro ferrico)] con la soluzione B [4% (w/v) 2,2'-dipiridile (in etanolo al 70%)].

*Acido ascorbico totale.* Venti microlitri di campione, 20  $\mu\text{l}$  di ditiotreitolo 5 mM in *buffer* fosfato 0,4 M (pH 7,4), sono stati aggiunti per ridurre l'ascorbato ossidato e la miscela è stata incubata per 20 minuti a 37 °C. Sono stati aggiunti dieci

microlitri di N-etil maleimmide (NEM; 0,5% (w/v) in acqua), mescolati e lasciati per 1 minuto a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 80  $\mu$ l di soluzione di reazione colorante (CR) come precedentemente descritto per l'AsA ridotto.

Entrambe le miscele finali dei saggi di AsA ridotto e totale sono state incubate a 37 °C per 40 minuti e misurate a 525 nm con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania) utilizzando come riferimento il TCA al 6%.

Sono state misurate tre repliche biologiche separate per ogni campione e tre repliche tecniche per ogni ripetizione biologica. La concentrazione è stata espressa in nmol di AsA secondo la curva standard, disegnata su un intervallo di 0-70 nmol; quindi i valori sono stati convertiti in mg/100 g di peso fresco (FW).

## 2.1.5 Determinazione del contenuto di fenoli totali

La quantità di composti fenolici totali è stata determinata secondo la procedura di Folin-Ciocalteu's (Singleton & Rossi, 1965).

250 mg di tessuto macinato sono stati omogeneizzati in 1 mL di metanolo al 60% in un mortaio con l'aiuto di un pestello. Gli estratti sono stati trasferiti in un tubo Falcon da 15 mL e il volume è stato portato a 5 ml aggiungendo metanolo al 60%.

I campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4 °C. In una Eppendorf da 2 mL sono stati miscelati 62,5  $\mu$ l di surnatante, 62,5  $\mu$ l di reattivo di Folin-Ciocalteu's (Sigma, St. Louis, MO, USA), 250  $\mu$ l di acqua deionizzata e incubati per 6 minuti al buio; successivamente sono stati aggiunti 625  $\mu$ l di carbonato di sodio al 7,5% e 500  $\mu$ l di acqua deionizzata. È seguita poi un'incubazione di 90 minuti a temperatura ambiente al buio. L'assorbanza è stata misurata a 760 nm con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania) utilizzando come riferimento il metanolo al 60%. La concentrazione di fenoli totali è stata espressa come mg GAE (acido gallico equivalente) /100 g di peso fresco (FW). Per ogni campione sono state misurate tre repliche biologiche separate e per ogni replica biologica sono state eseguite tre repliche tecniche.

## 2.1.6 Determinazione del contenuto di carotenoidi e tocoferoli

*Metodo spettrofotometrico.* Il contenuto delle clorofille a e b e dei carotenoidi nei frutti maturi di pomodoro coltivati in pieno campo è stato determinato mediante il metodo riportato da Wellburn (1994) e Zouari et al. (2014) con modifiche di Rigano et al. (2016).

500 mg di polvere di campione congelato sono stati estratti con 8 mL di acetone/esano (40/60, v/v), con l'aiuto di un pestello. La miscela è stata agitata a 300 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente e poi centrifugata a 5000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Questa procedura è stata ripetuta fino al completo raggiungimento dello sbiancamento dei tessuti utilizzati, raccogliendo il surnatante in un tubo Falcon da 50 ml dopo ogni centrifugata. L'assorbanza di 1 ml del surnatante estratto è stata misurata allo spettrofotometro NanoPhotometer™ (Implen, Monaco, Germania), a lunghezze d'onda differenti: 470 nm per i carotenoidi, a 453, 505, 645 e 663 nm per il licopene e il β-carotene, usando acetone/esano come riferimento. I carotenoidi totali, il licopene e il β-carotene sono stati determinati con l'equazione riportata da Wellburn (1994). La concentrazione è stata espressa come mg/100 g di peso fresco (FW). Tutte le repliche biologiche dei campioni sono state analizzate in triplo.

*Metodo HPLC.* I carotenoidi dei frutti di pomodoro coltivati in ambiente controllato sono stati estratti come descritto da Barja et al. (2021) e Ezquerro et al. (2022) con alcune modifiche. A 15 mg di materiale liofilizzato sono stati aggiunti 985 µl di solvente di estrazione (esano-acetone-ethanol, 2:1:1) e 15 µl di cantaxantina, un carotenoide non vegetale usato come standard interno. Vortexati per 10 secondi, e successivamente lisato il tessuto per 1 minuto con Tissuelyser II (Qiagen) a 30 Hz. Sono stati aggiunti 100 µl di acqua, nuovamente lisati per 1 minuto a 30 Hz e centrifugati a 3000 rpm per 3 minuti a 4 °C. La fase organica è stata trasferita in un tubo di 1,5 ml e il resto è stato riestratto aggiungendo 1 ml di solvente di estrazione, ripetendo il passaggio nel Tissuelyser a 30 Hz e la centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Le fasi organiche combinate sono state essiccate con il sistema Speed Vacuum, risospese in 150 µl di acetone e passate

attraverso un filtro di nylon da 0,2  $\mu\text{m}$  per la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). La separazione è stata effettuata con il sistema HPLC *Water Alliance 2695 Separations Module*. I carotenoidi sono stati monitorati con un rivelatore a serie di fotodiоди Waters 996, mentre i tocoferoli sono stati identificati con il rivelatore a fluorescenza Waters 2475 Multi  $\lambda$ . I dati sono stati raccolti e analizzati con il *software* Waters Millennium. La quantificazione è stata effettuata per confronto con gli standard commerciali.

## 2.1.7 Metaboliti primari

L'analisi dei metaboliti primari sui frutti coltivati in ambiente controllato è stata effettuata con il metodo descritto da Roessner et al. (2000) mediante GC-MS (gascromatografia – spettrometria di massa).

100 mg di polvere di pomodoro sono stati omogeneizzati con azoto liquido ed estratti in 1400  $\mu\text{L}$  di metanolo al 100% e 60  $\mu\text{L}$  di standard interno (0,2 mg/ml di ribitolo in acqua). La miscela è stata estratta per 15 minuti a 70 °C e centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante (500  $\mu\text{l}$ ) è stato trasferito in una nuova Eppendorf e sono stati aggiunti 250  $\mu\text{l}$  di cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ) e 500  $\mu\text{l}$  di acqua. La miscela è stata agitata per 15 secondi e centrifugata a 14000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Le aliquote del surnatante (150  $\mu\text{l}$ ) sono state essicate per almeno 3 ore senza riscaldamento. Il residuo secco è stato ridisciolto e derivatizzato per 2 ore a 37 °C (in 40  $\mu\text{l}$  di 20 mg/ml di cloridrato di metossiamina in piridina), seguito da un trattamento di 30 minuti a 37 °C con 70  $\mu\text{l}$  di MSTFA (N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamide) e 6  $\mu\text{l}$  di una miscela standard per il tempo di ritenzione (3,7% [w/v] acido eptanoico, 3,7% [w/v] acido pelargonico, 3,7% [w/v] acido undecanoico, 3,7% [w/v] acido tridecanoico, 3,7% [w/v] acido pentadecanoico, 7,4% [w/v] acido dodecanoico, 7,4% [w/v] acido tricosilico, 22,2% [w/v] acido carbocerico e 55,5% [w/v] acido entriacontanoico sciolto in 10 mg/mL tetraidrofurano).

Un volume di 2  $\mu\text{L}$  di campione è stato iniettato in modalità *splitless* e *split* 1:10 in un gascromatografo 6890 N (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA) accoppiato a uno spettrometro di massa Pegasus4D TOF (LECO, St. Joseph, MI).

La gascromatografia è stata eseguita su una colonna BPX35 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm) (SGE Analytical Science Pty Ltd., Australia) con elio come gas di trasporto, flusso costante di 2 ml/min. I cromatogrammi e gli spettri di massa sono stati valutati con il programma CHROMATO (LECO, St. Joseph, MI). I metaboliti sono stati identificati mediante confronto con una libreria personalizzata realizzata con standard commerciali.

## 2.1.8 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati mediante test parametrici ed utilizzando il *software* SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versione 28. È stata effettuata l'analisi ANOVA ad una via e successivo test t di Student per effettuare un confronto fra i genotipi. L'analisi dei metaboliti primari è stata eseguita con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), consultato il 13 dicembre 2022, per ottenere una *heat map*. La percentuale di variazione è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\begin{aligned} \text{Aumento o diminuzione (\%)} = \\ [(\text{valore del genotipo testato} - \text{valore di M82}) \times \text{valore di M82}^{-1}] \times 100 \end{aligned}$$

## 2.2 Risultati

Studi precedenti hanno permesso di identificare una sublinea R182, proveniente dall’incrocio tra una linea di introgressione *S. pennellii* in *S. lycopersicum* (IL7-3, accessione LA4102) con il genotipo coltivato M82 (accessione LA3475), che mostrava tratti qualitativi e agronomici superiori (Calafiore et al., 2019).

In questo elaborato di tesi è stata effettuata una più attenta caratterizzazione della sublinea identificata per confermare le migliori performance del genotipo allevato di pieno campo e in ambiente controllato. Analisi metabolomiche e biochimiche sono state inoltre condotte su R182 e su altre tre sublinee provenienti dallo stesso incrocio, per analizzare la qualità dei frutti e l’accumulo di antiossidanti e metaboliti primari.

### 2.2.1 Analisi della sublinea R182 allevata in pieno campo

I genotipi R182 e M82 sono stati sottoposti ad una prova sperimentale in condizione di pieno campo a Benevento in Campania per confrontare le prestazioni della sublinea rispetto al proprio parentale.

Nella Tabella 2.1 sono riportati i valori medi dei parametri biometrici misurati. In particolare, la produttività per pianta e l’altezza sono risultate più elevate in R182 rispetto al genotipo controllo M82, con un aumento rispettivamente del 28,96% e dell’11,84%. Invece, nessuna differenza significativa è stata osservata nel parametro peso fresco della biomassa.

**Tabella 2.1.** Parametri biometrici di M82 e R182 coltivate in pieno campo. I valori sono le medie  $\pm$ SD ( $n = 9$ ). Le differenze tra i due genotipi (M82 vs. R182) sono state valutate con il test t di Student. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Genotipo	M82	R182
Altezza (cm)	$64,20 \pm 7,07$	$71,80 \pm 5,96$ *
Peso fresco (g)	$316,00 \pm 57,97$	$314,00 \pm 65,35$
Resa (Kg/pt)	$0,37 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,02$ *

Per quanto concerne i parametri fisico-chimici, sono stati misurati: i solidi solubili totali, l’acidità titolabile e la consistenza della polpa dei frutti rossi maturi

per entrambi i genotipi. Il contenuto di solidi solubili totali dei frutti maturi del genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82 ha fatto registrare un valore medio di  $5,60 \pm 0,39$  °Brix, mentre la sublinea R182 presentava un valore medio significativamente più alto e pari a  $7,54 \pm 0,38$  °Brix (Tabella. 2.2). Analogamente anche l'acidità titolabile aveva valori più alti (+ 78,78%) nella sublinea R182 rispetto alla linea coltivata. Nessuna differenza in termini di consistenza del frutto maturo è stata riscontrata tra il genotipo R182 e il genotipo parentale M82 (Tabella 2.2).

**Tabella 2.2** Proprietà fisico chimiche dei frutti di M82 e R182 coltivati in pieno campo. I valori sono le medie  $\pm$ SD (n = 9). Le differenze tra i due genotipi (M82 vs. R182) sono state valutate con il test t di Student (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Genotipo	M82	R182
<b>Solidi solubili (°Brix)</b>	$5,60 \pm 0,39$	$7,54 \pm 0,38$ ***
<b>Acidità titolabile (g acido citrico/100 g FW)</b>	$0,33 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,06$ ***
<b>Consistenza della polpa (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	$5,73 \pm 0,68$	$6,15 \pm 0,59$

Altro aspetto valutato in pieno campo è stato il contenuto di antiossidanti e composti bioattivi nei frutti della sublinea di *S. pennellii* e del genotipo controllo M82. Queste analisi hanno permesso di evidenziare un accumulo significativamente più elevato di composti bioattivi, come gli antiossidanti lipofili e idrofili, nella sublinea R182 rispetto M82. Le analisi ANOVA hanno confermato il risultato ottenuto (Tabella S8.1).

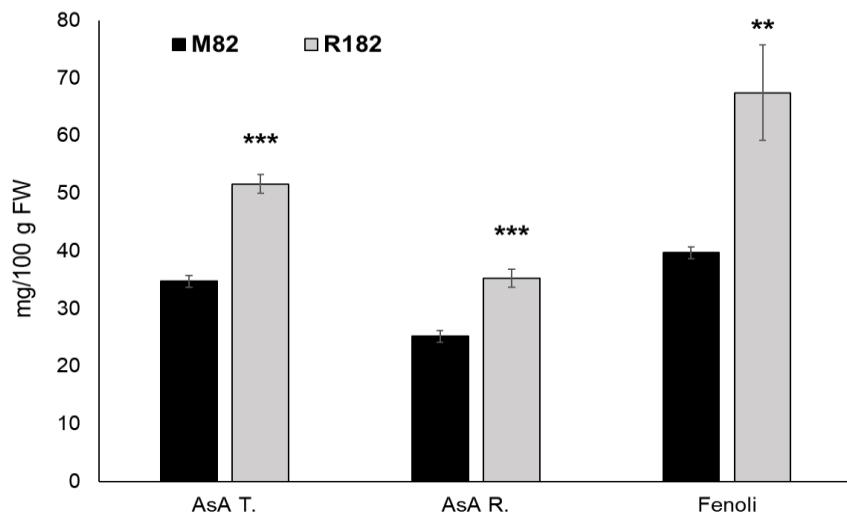
Utilizzando metodi spettrofotometrici è stato valutato il contenuto di antiossidanti lipofili nei frutti raccolti delle piante allevate in pieno campo. Nel confronto con il genotipo controllo M82, la sublinea R182 ha mostrato un aumento del 29,68% del contenuto di carotenoidi, e un aumento del 30,69% e del 28,57% del contenuto di licopene e  $\beta$ -carotene, rispettivamente (Tabella 2.3).

In maniera simile anche per la frazione idrofila della sublinea R182 è stato evidenziato un generale incremento. In particolare, la sublinea ha mostrato un aumento del 70% nella concentrazione media dei fenoli totali rispetto ai 39,71 mg GAE/100 g FW della linea coltivata M82 (Figura 2.1).

L'analisi della varianza (Tabella S8.1) abbinata al test t di Student ha consentito di identificare anche una concentrazione di acido ascorbico significativamente differente tra la sublinea R182 e il controllo M82. In particolare, è stato possibile notare un incremento del 48,57% nella quota di acido ascorbico totale e del 40,10% nella quota ridotta di acido ascorbico (Figura 2.1).

**Tabella 2.3.** Caratteristiche qualitative dei frutti di M82 e R182 coltivati in pieno campo. I valori sono le medie  $\pm$  SD (n = 9). Le differenze tra i due genotipi (M82 vs. R182) sono state valutate con il test t di Student (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Genotipo	M82	R182
<b>Carotenoidi totali (mg/100g FW)</b>	16,44 $\pm$ 1,83	21,32 $\pm$ 1,94 ***
<b>Licopene (mg/100g FW)</b>	1,01 $\pm$ 0,13	1,32 $\pm$ 0,13 ***
<b><math>\beta</math>-carotene (mg/100g FW)</b>	0,14 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01 ***

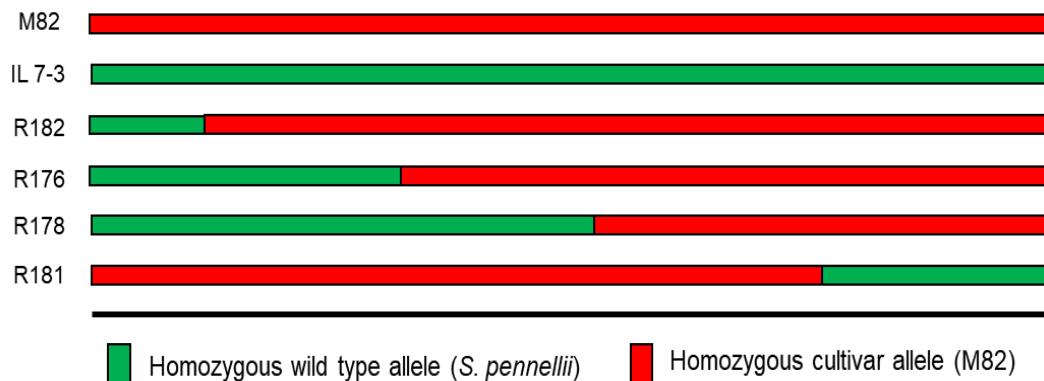


**Figura 2.1.** Contenuto di acido ascorbico totale (AsA T.), acido ascorbico ridotto (AsA R.) e fenoli totali dei frutti di M82 e R182 coltivati in pieno campo. Tutti sono espressi in mg 100 g<sup>-1</sup> FW. I valori sono le medie  $\pm$  SE (n = 9). Gli asterischi indicano le differenze statistiche di R182 rispetto a M82, valutate con il test t di Student (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

## 2.2.2 Analisi biochimiche e metabolomiche

Per una più attenta caratterizzazione della qualità dei frutti di R182, è stata effettuata una prova in ambiente controllato confrontando la stessa sublinea con altre sublinee (R176, R178, R181) provenienti dal medesimo incrocio tra IL7-3

(accessione LA4102) con il genotipo coltivato M82 (accessione LA3475) (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Dimensione e identità genomica delle quattro sublinee della linea d'introgressione 7-3 di *S. pennellii* (Calafiore et al, 2016).

I frutti rossi maturi sono stati utilizzati per analisi qualitative e metabolomiche. I primi parametri presi in esame sono state le principali proprietà fisico/chimiche del frutto e il colore.

La sublinea R182 e la R176 hanno mostrato un contenuto più alto di solidi solubili rispetto alle altre sublinee testate, con un incremento del 26,31% e 25,79%, rispettivamente, in confronto al parentale M82.

La consistenza del frutto maturo restava invariata tra il parentale M82 e la sublinea R182. I genotipi R178, R181 e R182 hanno mostrato un decremento significativo in termini di consistenza del frutto rispetto al parentale M82, riportando, rispettivamente, un decremento pari al 36,95%, al 71,62% e al 20,49% (Tabella 2.4).

L'indice di maturazione (misurato tramite colorimetro,  $((a^*)^2/(b^*)^2)$ ) ha confermato che i frutti raccolti il medesimo giorno dalle diverse sublinee erano allo stadio rosso maturo. Non sono state evidenziate differenze tra i diversi genotipi analizzati tranne che per la sublinea R178 che ha presentato uno sviluppo del colore  $(a^*/b^*)$  e un indice di maturazione significativamente inferiore rispetto al genotipo controllo M82 (Tabella 2.4).

**Tabella 2.4.** Proprietà fisico chimiche e colore dei frutti delle quattro sublinee e nella linea coltivata M82. I valori sono le medie  $\pm$ SD. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Genotipo	M82	R176	R178	R181	R182
<b>Solidi solubili (°Brix)</b>	4,24 $\pm$ 0,38	5,33 $\pm$ 1,21**	4,03 $\pm$ 0,52	4,23 $\pm$ 0,88	5,36 $\pm$ 0,17***
<b>Consistenza della polpa (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	21,21 $\pm$ 4,12	20,47 $\pm$ 3,00	13,38 $\pm$ 3,60**	6,02 $\pm$ 2,69***	16,87 $\pm$ 3,12*
<b>L*</b>	42,93 $\pm$ 2,26	42,35 $\pm$ 2,56	43,14 $\pm$ 3,95	41,80 $\pm$ 4,66	43,84 $\pm$ 1,81
<b>a*</b>	31,42 $\pm$ 2,56	29,48 $\pm$ 2,30	29,80 $\pm$ 1,81	29,46 $\pm$ 4,96	34,73 $\pm$ 1,94*
<b>b*</b>	32,86 $\pm$ 3,80	32,39 $\pm$ 4,68	35,76 $\pm$ 4,46	33,27 $\pm$ 7,33	35,57 $\pm$ 3,57
<b>a*/b*</b>	0,96 $\pm$ 0,08	0,92 $\pm$ 0,08	0,84 $\pm$ 0,07**	0,90 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,12
<b>(a*)<sup>2</sup>/(b*)<sup>2</sup></b>	0,93 $\pm$ 0,16	0,85 $\pm$ 0,15	0,71 $\pm$ 0,11 **	0,84 $\pm$ 0,30	0,99 $\pm$ 0,25
<b>((a*)<sup>2</sup>+(b*)<sup>2</sup>)<sup>0.5</sup></b>	45,50 $\pm$ 4,16	43,83 $\pm$ 4,84	46,58 $\pm$ 4,45	44,60 $\pm$ 7,84	49,79 $\pm$ 2,78**

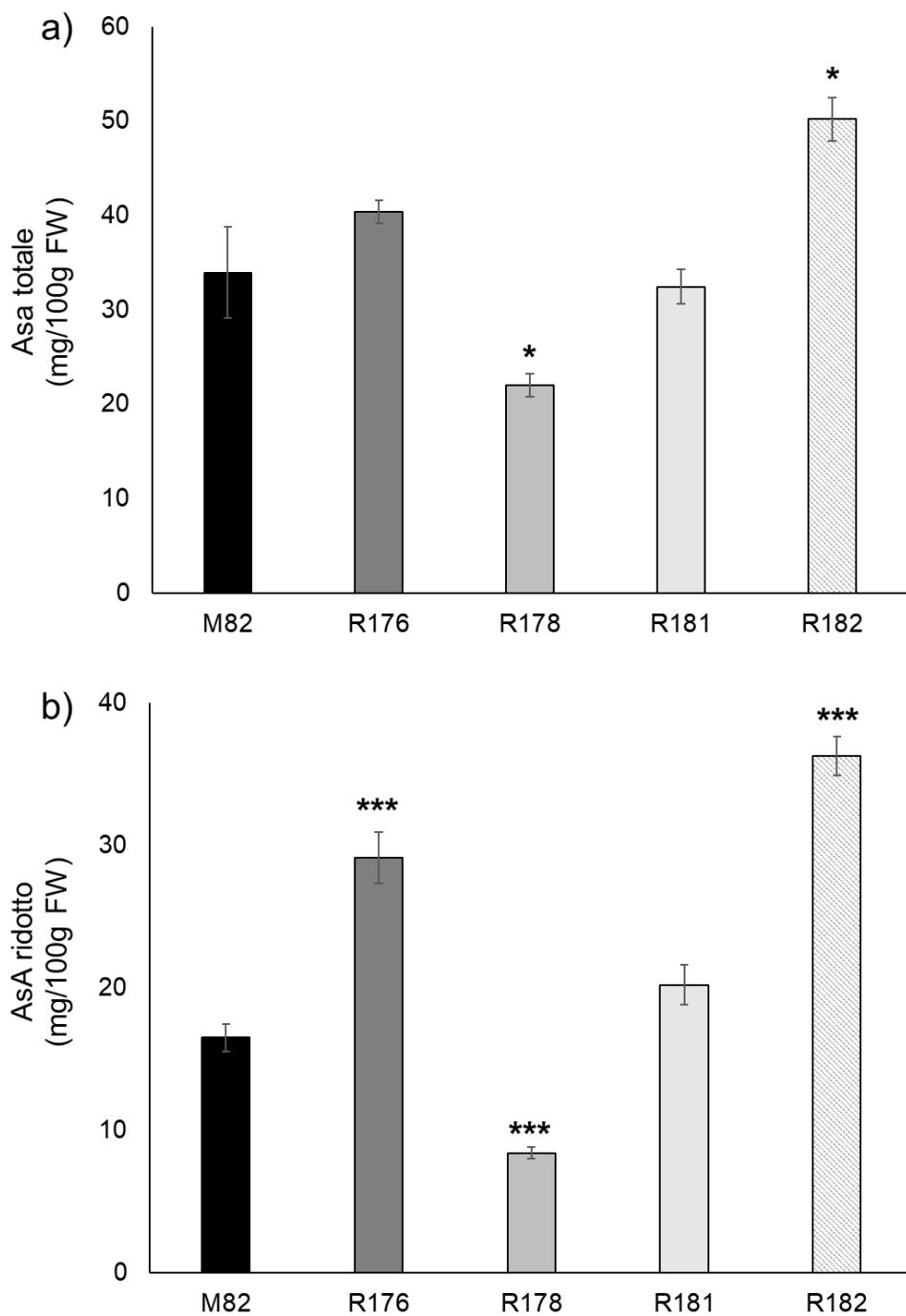
L’analisi metabolica è stata condotta mediante HPLC su estratti dei frutti interi di pomodoro presso il laboratorio di metabolomica del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP – Valencia, Spagna). Questa metodologia ha permesso una più dettagliata analisi della quantità e del tipo di metaboliti presenti nelle diverse sublinee e nel genotipo parentale M82. L’analisi metabolomica ha mostrato una grande variabilità tra le diverse sublinee. In particolare, la sublinea R176 ha mostrato il più alto contenuto di fitoene (90,42 $\pm$ 14,36  $\mu$ g/g DW) e  $\beta$ -carotene (63,86 $\pm$ 3,28  $\mu$ g/g DW) rispetto alle altre linee. Al contrario, la sublinea che ha mostrato livelli più bassi di questa particolare classe di composti è stata la linea R178, che presentava 10,29 $\pm$ 0,74  $\mu$ g/g DW di fitoene. Questa linea, inoltre accumulava 12,36 $\pm$ 1,50  $\mu$ g/g DW di luteina e 541,59 $\pm$ 27,40  $\mu$ g/g DW di carotenoidi totali. Questi valori erano nettamente più bassi rispetto al genotipo M82 che accumulava 718,58 $\pm$ 30,19  $\mu$ g/g DW di carotenoidi totali (Tabella 2.5).

**Tabella 2.5.** Contenuto dei principali carotenoidi e del tocoferolo nelle quattro sublinee e nella linea coltivata M82. I valori sono le medie ed espressi in  $\mu\text{g/g}$  DW. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Genotipo	M82	R176	R178	R181	R182
<b>Fitoene</b>	36,39 $\pm$ 6,32	90,42 $\pm$ 14,36**	10,29 $\pm$ 0,74**	26,49 $\pm$ 1,72	33,57 $\pm$ 6,56
<b>Luteina</b>	13,65 $\pm$ 1,97	16,27 $\pm$ 2,29	12,36 $\pm$ 1,50	18,39 $\pm$ 5,86	15,25 $\pm$ 2,89
<b><math>\beta</math>-carotene</b>	57,75 $\pm$ 0,36	63,86 $\pm$ 3,28*	51,19 $\pm$ 4,16	75,57 $\pm$ 2,11***	51,11 $\pm$ 2,41**
<b>Licopene</b>	610,78 $\pm$ 32,82	596,07 $\pm$ 54,18	467,75 $\pm$ 28,27**	635,18 $\pm$ 121,81	645,48 $\pm$ 61,06
<b>Carotenoidi totali</b>	718,58 $\pm$ 30,19	766,62 $\pm$ 63,25	541,59 $\pm$ 27,40**	755,63 $\pm$ 120,33	745,41 $\pm$ 64,37
<b>Tocoferolo</b>	16913,54 $\pm$ 220,19	27591,01 $\pm$ 672,85***	15610,04 $\pm$ 866,25	21569,31 $\pm$ 3699,52	19405,34 $\pm$ 1497,11*

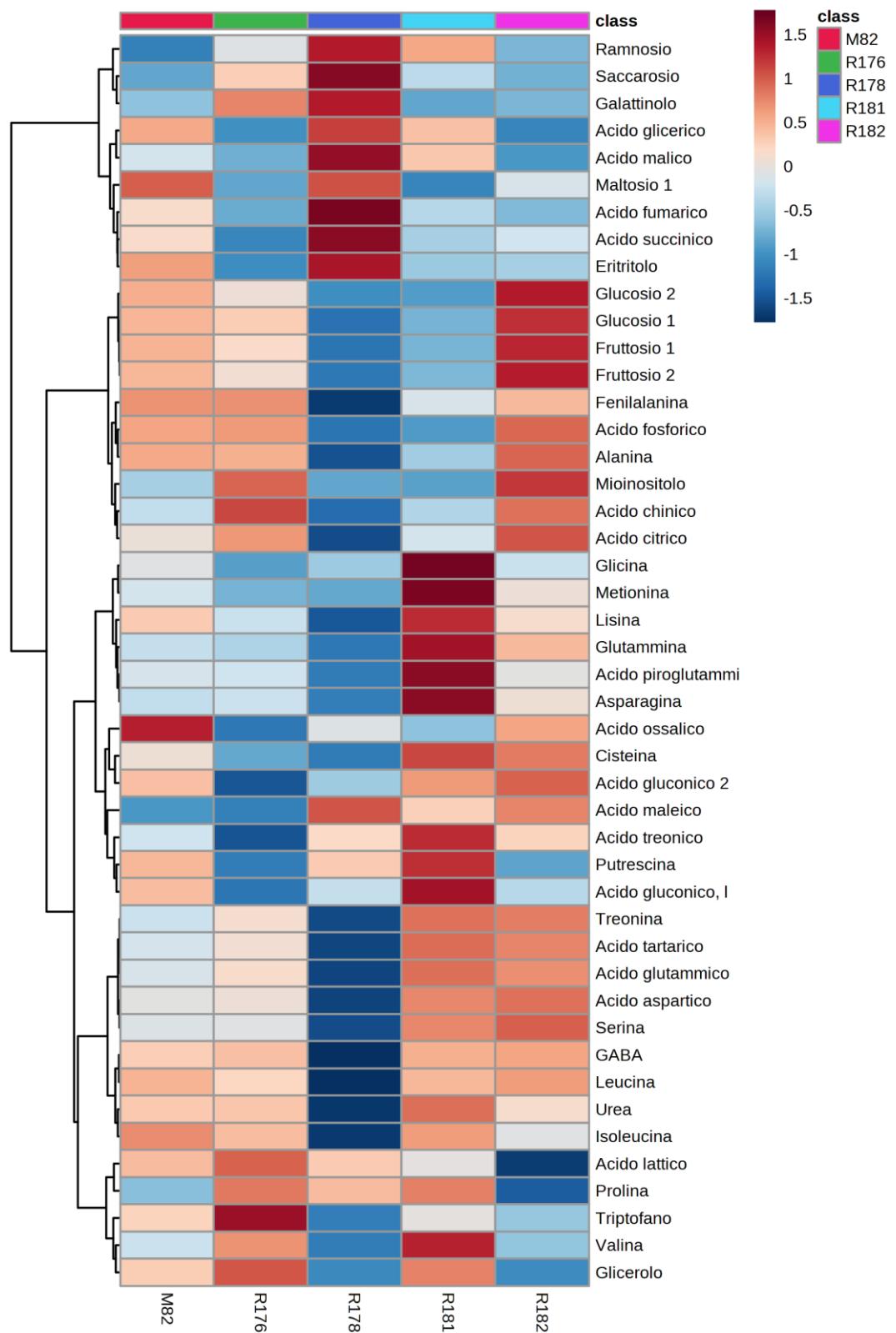
È stato registrato un accumulo variabile di antiossidanti, come affermato anche dall' analisi ANOVA (Tabella S8.2) nelle quattro sublinee della *S. pennelli* IL 7-3, mostrando come unica costante il più alto contenuto di antiossidanti idrofili nel genotipo R182.

Nel genotipo controllo *S. lycopersicum* cv. M82 la concentrazione di AsA totale è stata pari a 33,97 $\pm$ 10,75 mg/100 g FW, mentre la sublinea R182 ha mostrato una concentrazione di AsA pari a 50,19 $\pm$ 6,89 mg/100 g FW (Figura 2.3, a). La sublinea ha presentato, quindi, un incremento del 47,78% di acido ascorbico totale e del 119,94% di acido ascorbico ridotto rispetto a M82 (Figura 2.3, b). Risultati interessanti in termini di contenuto di acido ascorbico ridotto sono stati evidenziati anche nelle sublinee R176 e R181, in cui è stato dimostrato un aumento del 76,74% e del 22,43%, rispettivamente rispetto al genotipo controllo. L'unica sublinea a mostrare un decremento del contenuto di acido ascorbico totale e ridotto rispetto a M82 è risultata essere la R178, in cui è stata dimostrata una diminuzione del 48,96% di acido ascorbico ridotto e del 35,07% di acido ascorbico totale (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Contenuto di a) acido ascorbico totale e b) ridotto nei frutti maturi della linea coltivata M82 e delle sublinee R176, R178, R181 e R182. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Gli asterischi indicano le differenze statistiche di R182 rispetto a M82 mediante il test t di Student (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

I dati relativi al contenuto di metaboliti primari ottenuti tramite tecnica GC (gascromatografia) sono stati rappresentati per mezzo di un grafico di tipo *heat map*, dove come variabili (colonne) sono stati riportati i genotipi e come osservazioni (righe) i diversi metaboliti rilevati (Figura 2.4). I diversi genotipi hanno mostrato andamenti molto diversi riguardo l'accumulo di metaboliti che possono essere utilizzati come precursori della via biosintetica dell'acido ascorbico. In particolare, i genotipi R182, R176 e il parentale M82 hanno mostrato una concentrazione maggiore di monosaccaridi quali glucosio e fruttosio, mentre la sublinea R178 mostrava maggiori concentrazioni di saccarosio. Un altro andamento interessante si notava nella sublinea R181 riguardo la concentrazione di amminoacidi. Quest'ultima linea presentava infatti alte concentrazioni di amminoacidi essenziali (metionina e lisina) e non essenziali (glicina e asparagina) rispetto al parentale M82 e alle altre sublinee saggiate, eccezion fatta per la sublinea R178 che invece presentava le più basse concentrazioni di quasi tutti i metaboliti misurati.



**Figura 2.4.** Heat map ottenuta dall'analisi metabolomica delle quattro sublinee IL7-3 e il genotipo coltivato M82. La figura è stata generata utilizzando il pacchetto di programmi <https://www.metaboanalyst.ca/> (accesso il 13 dicembre 2022).

### **3 La tecnica CRISPR/Cas9 per identificare i geni candidati responsabili dell'accumulo di acido ascorbico**

---

## 3.1 Materiali e metodi

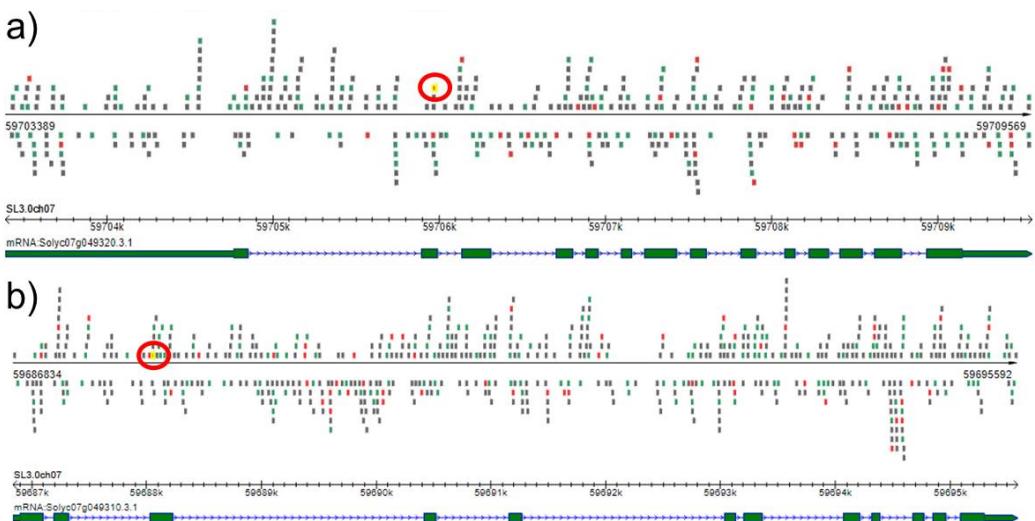
### 3.1.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato per la trasformazione genetica consisteva nella sublinea R182 di *S. pennellii* di IL7-3 e nel genotipo coltivato M82 (LA3475). I semi di pomodoro sono stati lavati e lasciati per 5 minuti in etanolo (EtOH) al 70%. Eliminata la soluzione di EtOH è stata aggiunta una soluzione contenente ipoclorito di sodio al 25% con 0,1 di laurisolfato di sodio (SDS). Dopo agitazione per 20 minuti, i semi sono stati risciacquati più volte con acqua sterile distillata. I semi sono stati posti in un contenitore Magenta™ contenente il terreno di coltura MS/2. Questo substrato di crescita è composto da Murashige e Skoog con vitamine, saccarosio (30 g/l) e agar (8 g/l), con un pH di 5,8. I semi sono stati fatti crescere in una camera di crescita a 24 °C con un fotoperiodo di 16 ore di luce ed 8 ore di buio. I cotiledoni utilizzati per la trasformazione erano completamente espansi, generalmente dopo 10/15 giorni dalla semina.

### 3.1.2 Disegno *single guide RNA* (sgRNA) e clonaggio

Due costrutti CRISPR/Cas9 sono stati utilizzati per generare mutazioni nelle sequenze codificanti per i geni *Major Facilitator Superfamily Protein* (MFSP - Solyc07g049310) e *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT - Solyc07g049320). Per ogni gene, una sequenza bersaglio è stata progettata utilizzando lo strumento web CRISPR-P ([//cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR](http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR)). Queste sequenze si trovano nel secondo esone per il gene NAT e nel terzo esone per il gene MFSP (Figura 3.1).

Le due sequenze candidate sono state sintetizzate (Eurofins Genomics) come coppie di oligonucleotidi (Tabella 3.1).



**Figura 3.1.** Le guide per il gene a) NAT e b) MFSP sono state progettate utilizzando lo strumento web CRISPR-P.

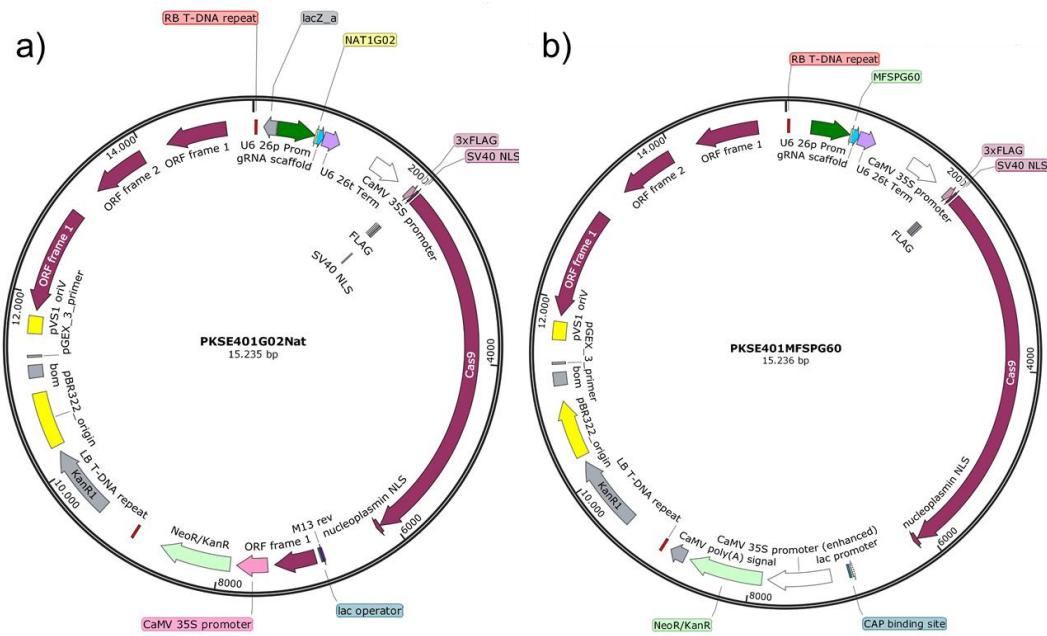
**Tabella 3.1.** Elenco degli oligonucleotidi utilizzati per il clonaggio.

Gene bersaglio	sgRNA	Nome	Sequenza 5' >> 3'
NAT	02	ForNATg02	<b>ATTG GCGCTTGTACCCTTAATGGG</b>
		RevNATg02	<b>AAAC CCCATTAAGGGTACAAGCGC</b>
MFSP	60	ForMFSPg60	<b>ATTG TGTCGATTGCCAAAGAGCTT</b>
		RevMFSPg60	<b>AAAC AAGCTCTTGGCAATCGACA</b>

Ciascun oligonucleotide portava basi extra per consentire il clonaggio delle sequenze target nel sito BsaI situato tra il promotore AtU6 e lo *scaffold* gRNA del vettore binario vegetale pKSE401 (Addgene plasmid #62202) (Xing et al., 2014) già utilizzato nel pomodoro per l'*editing* di geni coinvolti nel metabolismo dei carotenoidi (D'Ambrosio et al., 2018). I clonaggi sono stati eseguiti utilizzando il *NEB® Golden Gate Assembly Kit* e sono state usate le *Stellar™ Competent Cells*. Queste cellule competenti sono cellule batteriche di *Escherichia Coli* ceppo HST08. Le cellule competenti sono state trasformate tramite uno shock termico a 42 °C per 45 secondi. Dopo l'incubazione a 37 °C per 1 ora, le cellule competenti trasformate sono state piastrate su una piastra Petri con un terreno selettivo e fatte crescere *overnight* a 37 °C. Il terreno utilizzato è *Lysogeny broth* o Luria-Bertani (LB) che contiene bacto-triptone (10 g/l), estratto di lievito (5 g/l), cloruro di sodio (10 g/l), bacto-agar (15 g/l) e come selettivo 50mg/l di Kanamicina. Successivamente

tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è stata verificata la presenza della cassetta Cas9/sgRNA. Nella reazione di amplificazione è stato utilizzato l'*universal primer* M13 (5'-AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT-3') come *forward primer* per entrambi i geni. Il *reverse primer* era specifico per ogni cassetta Cas9/sgRNA, 5'-AAACAAAGCTTTGGCAATCGACA-3' per il gene MFSP, 5'-AAACCCCATTAAGGGTACAAGCG-3' per il gene NAT. Le colonie risultate trasformate sono state fatte crescere in LB liquido con il selettivo (50mg/l di Kanamicina) per una notte a 37 °C in agitazione. Da queste colonie è stato estratto il plasmide con il kit *PureLink™ Quick Plasmid* e quantificato sia con il NanoDrop (Thermo Scientific) e sia tramite PCR.

I due vettori binari derivati sono stati denominati rispettivamente pKSE401NATg02 e pKSE401MFSPg60 (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Mappa dei plasmidi utilizzati per il clonaggio del gene a) NAT e b) MFSP.

### 3.1.3 Trasformazione di *Agrobacterium tumefaciens*

I plasmidi pKSENATg02 e pKSEMFSPg60 contenenti la sequenza bersaglio sono stati trasferiti in cellule elettrocompetenti di *Agrobacterium tumefaciens* ceppo LBA4404 mediante elettroporazione. La tecnica consiste nell'aggiungere a 40  $\mu$ l di cellule elettrocompetenti, 2  $\mu$ l di plasmide estratto in cuvette per

l'elettroporazione (Bio-rad) e nell'applicazione di una differenza di potenziale di 2470 V per 4,6 ms. Le cellule elettroporate sono state fatte crescere a 28 °C per circa 2 ore in 500 µl di YEB liquido. YEB è un terreno con estratto di carne (5 g/l) e di lievito (1 g/l), peptone (1 g/l), saccarosio (5 g/l) e cloruro di magnesio (1 g/l). Al termine sono state piastrate su piastra Petri contenente il terreno YEB con diversi selettivi (500 mg/l streptomicina, 100mg/l rifampicina e 50mg/l kanamicina) e incubate a 28 °C *overnight*. Successivamente tramite PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è stata verificata la presenza della casetta Cas9/sgRNA. Nella reazione di amplificazione è stato utilizzato l'*universal primer* M13 (5'-AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT-3') come *forward primer* per entrambi i geni. Il *reverse primer* era specifico per ogni casetta Cas9/sgRNA, 5'-AAACAAGCTTTGGCAATCGACA-3' per il gene MFSP, 5'-AAACCCATTAAGGGTACAAGCG-3' per il gene NAT. Le colonie risultate trasformate sono state fatte crescere in YEB con i 3 antibiotici selettivi. La crescita di *A. tumefaciens* è stata controllata tramite spettrofotometro leggendo l'O.D (*Optical Density*) a 660 mn. Per ottenere un O.D. finale intorno a 0,6, l'inoculo è stato centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti. Al termine di ogni centrifuga è stato eliminato il surnatante e il pellet è stato risospeso in MSO. MSO è un terreno liquido contenente Murashige e Skoog con vitamine e saccarosio (30 g/l). Riletto l'O.D., in base al valore ottenuto l'inoculo è stato diluito o concentrato con MSO.

### **3.1.4 Trasformazione genetica mediante *A. tumefaciens***

Per questo processo di trasformazione genetica è stato utilizzato un protocollo di rigenerazione *in vitro* già selezionato e saggiato in precedenza nel laboratorio del Centro Ricerche Metapontum Agrobios – Agenzia Lucana per lo Sviluppo e l'Innovazione in Agricoltura (ALSIA).

Prima di procedere con la trasformazione genetica, è stata eseguita una prova di rigenerazione con la sublinea R182. La procedura applicata è quella descritta di seguito però i cotiledoni non sono stati infettati con *Agrobacterium tumefaciens*. La stessa tecnica è stata usata anche per i cotiledoni controllo di M82 e R182 utilizzati durante la trasformazione genetica.

I cotiledoni della sublinea R182 sono stati prelevati e immersi in terreno liquido MSO in piastre Petri che contenevano l'inoculo di *A. tumefaciens* ottenuto precedentemente e lasciati per 10 minuti. Dopodiché gli espianti sono stati posizionati su terreno di coltura CC (Co-Cultivation), con 0,5mg/ml di acetosiringone che permette di aumentare la virulenza del ceppo (Godwin et al., 1991), e carta sterile sulla parte superiore del substrato. Le piaste sono state lasciate per due giorni al buio a 24 °C. Dopo il periodo di co-coltivazione, gli espianti sono stati trasferiti in una piastra contenente il terreno CR (Callus for Rigeneration) con 500mg/l di carbenicillina e 40mg/l di kanamicina. Gli espianti sono stati messi in camera di crescita a 24 °C con un fotoperiodo 16/8. Gli espianti sono stati trasferiti su terreno fresco con carbenicillina e kanamicina ogni due settimane. Dopo tre/quattro settimane, gli espianti sono stati trasferiti sul terreno di coltura *plant*. Una volta ottenuti i germogli rigenerati dai calli, sono stati trasferiti sul terreno di coltura *root* per permettere la radicazione. Ogni 20/30 giorni i germogli sono stati messi su un terreno fresco e quelli ben radicati sono stati trasferiti in serra.

Nella Tabella 3.2 sono stati riportati i componenti dei vari terreni di coltura utilizzati.

**Tabella 3.2.** Composizione dei terreni di coltura.

Componenti	CC	CR	Plant	Root
<b>MS Salts</b>	4,3 g/l	4,3 g/l	4,3 g/l	2,2 g/l
<b>Saccarosio</b>	30 g/l	30 g/l	30 g/l	15 g/l
<b>Bacto - agar</b>	8 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l
<b>IAA</b>	0,2 mg/l	0,2 mg/l	-	-
<b>NAA</b>	-	-	-	0,1 mg/l
<b>Zeatina-riboside</b>	1,5 mg/l	1,5 mg/l	1,9 mg/l	-
<b>Carbenicillina</b>	-	500 mg/l	500 mg/l	250 mg/l
<b>Kanamicina</b>	-	50 mg/l	50 mg/l	25 mg/l
<b>Acetosiringone</b>	0,5 mg/ml	-	-	-
<b>Acido folico</b>	-	-	0,5 mg/l	-
<b>Biotina</b>	-	-	0,05 mg/l	-
<b>Ancymidol</b>	-	-	-	0,5 mg/l

### 3.1.5 Screening delle piante T<sub>0</sub> trasformate

Le piante in serra, ottenute dalla trasformazione con i geni NAT e MFSP, sono state sottoposte ad uno screening molecolare per controllare la presenza della casetta Cas9/sgRNA e sequenziate per verificare l'*editing*.

#### *Estrazione del DNA*

Il DNA genomico è stato estratto da foglie giovani utilizzando il metodo riportato in Peterson et al. (1997) con delle modifiche. Il materiale vegetale è stato macinato con l'uso di mortaio e pestello in presenza di azoto liquido fino ad ottenere una polvere. In una Eppendorf da 2ml sono stati pesati 300 mg di tessuto macinato e aggiunto 300  $\mu$ l di *buffer* di estrazione (0,35 M di sorbitolo, 0,1 M di Tris, 0,005 M di EDTA bisodico e 0,02 M di sodio bisolfito). Dopo Vortex per 30 secondi, la soluzione è stata centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Il pellet è stato risospeso con 150  $\mu$ l di *buffer* di estrazione, 150  $\mu$ l di *Nuclei Lysis Buffer* [0,2 M di Tris pH 7,5, 0,05 M EDTA, 2,0 M di cloruro di sodio e 2% w/v di bromuro di cetil-trimetilammonio (CTAB)] e 60  $\mu$ l di sarcosyl al 5%. Le soluzioni sono state incubate a 65 °C per 30 minuti. Dopo l'incubazione, alla miscela sono stati aggiunti 300  $\mu$ l di cloroformio ed è stata centrifugata a 13000 rpm per 5 minuti. Al surnatante è stato aggiunto 1 volume di isopropanolo ed è stato centrifugato a 13000 rpm per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in etanolo 70 %. La miscela è stata centrifugata e asciugata con lo Speed Vacuum. Successivamente, il pellet è stato risospeso in acqua con 100  $\mu$ g/ml di RNase e incubato a 37 °C per 15 minuti. Il volume della miscela è stato portato a 300  $\mu$ l con acqua e sono stati aggiunti 300  $\mu$ l fenolo-cloroformio 1:1. Al termine di una centrifugazione a 13000 rpm di 5 minuti, la parte superiore del surnatante è stata trasferita in una nuova Eppendorf di 1,5 ml a cui sono stati aggiunti 1/10 di sodio acetato e 2 volumi di etanolo al 100%. Le Eppendorf sono state incubate 15 minuti in ghiaccio e poi centrifugate. Il surnatante è stato eliminato e il pellet lavato come precedentemente descritto. Al termine il pellet è stato risospeso in 30  $\mu$ l di acqua.

Il DNA estratto è stato quantificato sia con l'utilizzo del NanoDrop (Thermo Scientific) e sia sul gel di agarosio al 0,8%, stimando la concentrazione per confronto visivo con la concentrazione nota del DNA del fago  $\lambda$ . Il DNA è stato conservato a 4 °C.

### Verifica della presenza della casetta Cas9/sgRNA e dell'editing

Per identificare le piante trasformate è stata amplificata la casetta Cas9/sgRNA mediante PCR utilizzando come *forward primer* l'*universal primer* M13 (5'-AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT-3') per entrambi i geni. Il *reverse primer* è specifico per ogni casetta Cas9/sgRNA, 5'-AAACAAGCTTTGGCAATCGACA-3' per il gene MFSP, 5'-AAACCCATTAAGGGTACAAGCG-3' per il gene NAT. La reazione di PCR è stata eseguita in base al protocollo della Taq polimerasi DreamTaq della Thermo Scientific. Successivamente, la verifica della presenza della casetta Cas9/sgRNA è stata fatta sul gel d'agarosio al 1,2% e le bande sono state visualizzate con il tranilluminatore UV (ChemiDoc Touch Imaging Systeme – BioRad).

La verifica dell'*editing* è stata fatta solo sulle piante risultate Cas9 positive. Un frammento per ciascun gene contenente la sequenza bersaglio del DNA è stato amplificato mediante PCR con una coppia di *primer* specifici del gene (Tabella 3.3). La reazione di PCR è stata eseguita in base al protocollo della Taq polimerasi DreamTaq della Thermo Scientific. Successivamente, la verifica della presenza del frammento è stata fatta sul gel d'agarosio al 1,2% e le bande sono state visualizzate con il tranilluminatore UV (ChemiDoc Touch Imaging Systeme – BioRad). I prodotti di PCR e quindi i frammenti amplificati sono stati purificati con il kit *DNA Clean & Concentratot<sup>TM</sup>* – 5 (Zymo Research) e sequenziati tramite il servizio di sequenziamento fornito da Eurofins Genomics (Ebersberg, Germania). I chromatogrammi ottenuti sono stati analizzati con il *software* SnapGene per verificare l'*editing*.

**Tabella 3.3.** *Primer* utilizzati per amplificare il segmento contenente la sequenza bersaglio.

Gene bersaglio	Nome	Sequenza 5' >> 3'
NAT	SINAT1SeqFOR	TCTGCAGTTGAAACCATCTTGT
	SINAT1SeqREV	TGTATAACCCTTGCTTGCCC
MFSP	SpMFSP5endSeqFOR	TCTGGTCTGGGCTCTGAAT
	SpMFSP5endSeqREV	CCTTACAATTGCCCAAGAATA

### **3.1.6 Screening della generazione T<sub>1</sub>**

I semi provenienti da linee transgeniche selezionate T<sub>0</sub>, sia del gene NAT e sia del gene MFSP, sono stati coltivati in ambiente controllato nell'anno 2022 presso le serre del Centro Ricerche Metapontum Agrobios – Agenzia Lucana per lo Sviluppo e l'Innovazione in Agricoltura (ALSIA).

Le piante con 4-5 foglie espanso sono state sottoposte a *screening* per la presenza della cassetta Cas9/sgRNA mediante PCR utilizzando il protocollo della Taq polimerasi DreamTaq (Thermo Scientific). I primer utilizzati per entrambe le reazioni sono stati riportati in Tabella 3.3. I prodotti di PCR e quindi i frammenti amplificati sono stati purificati con il kit *DNA Clean & Concentratot<sup>TM</sup> – 5* (Zymo Research) e sequenziati tramite il servizio di sequenziamento fornito da Eurofins Genomics (Ebersberg, Germania). I cromatogrammi ottenuti sono stati analizzati con il *software* SnapGene per verificare l'*editing*. Con lo stesso *software* sono state tradotte le sequenze codificanti (CDS; *Coding DNA Sequence*) dei geni delle piante mutate in sequenze proteiche. Successivamente con il *tool* online Clustal Omega è stato eseguito l'allineamento con la regione target per verificare se le mutazioni ottenute influenzavano la formazione della proteina.

I frutti di pomodoro delle piante trasformate sono stati raccolti allo stadio di rosso maturo (MR). Successivamente, i semi sono stati rimossi e i frutti sono stati macinati in azoto liquido con un frullatore (FRI150, Fimar) fino a ottenere una polvere fine e conservati a -80 °C per le successive analisi.

### **3.1.7 Analisi del contenuto di solidi solubili**

I frutti delle piante T<sub>1</sub> selezionate sono stati raccolti allo stadio rosso maturo per valutare il contenuto di solidi solubili. Questa analisi è stata effettuata utilizzando una goccia di succo del campione e tramite il rifrattometro portatile digitale HI 96801 Hanna Instruments, che utilizza la misura dell'indice di rifrazione, è stato determinato il contenuto zuccherino (°Brix).

### **3.1.8 Determinazione del contenuto di acido ascorbico**

L'acido ascorbico (AsA) è stato determinato sui frutti maturi di pomodoro delle piante T<sub>1</sub> selezionate ed è stato misurato usando il metodo colorimetrico descritto da Stevens et al. (2006) con alcune modifiche riportate da Rigano et al. (2014).

A 500 mg di campione congelato a -80 °C e ridotto in polvere sono stati aggiunti 300 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 6% freddo in una Eppendorf da 2 ml. I campioni sono stati vortexati per 10 secondi e lasciati in ghiaccio per 15 minuti. Sono stati, quindi, centrifugati a 14000 rpm per 20 minuti a 4 °C.

Venti microlitri di campione, 20 µl di ditiotreitolo 5 mM in *buffer* fosfato 0,4 M (pH 7,4), sono stati aggiunti per ridurre l'ascorbato ossidato e la miscela è stata incubata per 20 minuti a 37 °C. Sono stati aggiunti dieci microlitri di N-etil maleimmide (NEM; 0,5% (w/v) in acqua), mescolati e lasciati per 1 minuto a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 80 µl di soluzione di reazione colorante (CR). Questa soluzione è stata preparata unendo la soluzione A [31% (w/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (acido fosforico), 4,6% (w/v) TCA e 0,6% (w/v) FeCl<sub>3</sub> (cloruro ferrico)] con la soluzione B [4% (w/v) 2,2'-dipiridile (in etanolo al 70%)]. La miscela finale è stata incubata a 37 °C per 40 minuti e misurata a 525 nm con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania) utilizzando come riferimento il TCA al 6%.

Sono state misurate tre repliche tecniche e tre repliche biologiche per ogni campione. La concentrazione è stata espressa in nmol di AsA secondo la curva standard, disegnata su un intervallo di 0-70 nmol; quindi i valori sono stati convertiti in mg/100 g di peso fresco (FW).

### **3.1.9 Determinazione del contenuto di carotenoidi e tocoferoli**

I carotenoidi dei frutti di pomodoro delle piante T<sub>1</sub> selezionate sono stati estratti come descritto da Barja et al. (2021) e Ezquerro et al. (2022) con alcune modifiche. A 15 mg di materiale liofilizzato sono stati aggiunti 985 µl di solvente di estrazione (esano-acetone-ethanolo, 2:1:1) e 15 µl di cantaxantina, un carotenoide non vegetale usato come standard interno. La soluzione è stata miscelata per 10 secondi, e successivamente il tessuto è stato lisato per 1 minuto con il Tissuelyser II (Qiagen)

a 30 Hz. Sono stati aggiunti 100  $\mu$ l di acqua, e il tessuto è stato nuovamente lisato per 1 minuto a 30 Hz. Dopo centrifugazione a 3000 rpm per 3 minuti a 4 °C, la fase organica è stata trasferita in un tubo di 1,5 ml e il resto è stato riestratto aggiungendo 1 ml di solvente di estrazione, ripetendo il passaggio nel Tissuelyser a 30 Hz e la centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Le fasi organiche combinate sono state essicate con il sistema Speed Vacuum, risospese in 150  $\mu$ l di acetone e passate attraverso un filtro di nylon da 0,2  $\mu$ m per la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC). La separazione è stata effettuata con il sistema HPLC *Water Alliance 2695 Separations Module*. I carotenoidi sono stati monitorati con *Waters 996 Photodiode Array Detector*, mentre i tocoferoli sono stati identificati con *Waters 2475 Multi- $\lambda$  Fluorescence Detector*. I dati sono stati raccolti e analizzati con il *software* *Waters Millennium*. La quantificazione è stata effettuata per confronto con gli standard commerciali.

### 3.1.10 Metaboliti primari

L'analisi dei metaboliti primari sui frutti coltivati in ambiente controllato è stata effettuata con il metodo descritto da Roessner et al. (2000) mediante GC-MS (gascromatografia – spettrometria di massa).

100 mg di polvere di pomodoro sono stati omogeneizzati con azoto liquido ed estratti in 1400  $\mu$ L di metanolo al 100% e 60  $\mu$ l di standard interno (0,2 mg/ml di ribitolo in acqua). La miscela è stata estratta per 15 minuti a 70 °C e centrifugata a 14000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante (500  $\mu$ l) è stato trasferito in una nuova Eppendorf e sono stati aggiunti 250  $\mu$ l di cloroformio ( $\text{CHCl}_3$ ) e 500  $\mu$ l di acqua. La miscela è stata agitata per 15 secondi e centrifugata a 14000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Le aliquote del surnatante (150  $\mu$ l) sono state essicate per almeno 3 ore senza riscaldamento. Il residuo secco è stato ridisciolto e derivatizzato per 2 ore a 37 °C (in 40  $\mu$ l di 20 mg/ml di cloridrato di metossiamina in piridina), seguito da un trattamento di 30 minuti a 37 °C con 70  $\mu$ l di MSTFA (N-metil-N-[trimetilsilil]trifluoroacetamide) e 6  $\mu$ l di una miscela standard per il tempo di ritenzione (3,7% [w/v] acido eptanoico, 3,7% [w/v] acido pelargonico, 3,7% [w/v] acido undecanoico, 3,7% [w/v] acido tridecanoico, 3,7% [w/v] acido pentadecanoico, 7,4% [w/v] acido dodecanoico, 7,4% [w/v] acido

tricosilico, 22,2% [w/v] acido carbocerico e 55,5% [w/v] acido entriacontanoico sciolto in 10 mg/mL tetraidrofurano).

Un volume di 2  $\mu$ L di campione è stato iniettato in modalità *splitless* e *split* 1:10 in un gascromatografo 6890 N (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA) accoppiato a uno spettrometro di massa Pegasus4D TOF (LECO, St. Joseph, MI).

La gascromatografia è stata eseguita su una colonna BPX35 (30 m  $\times$  0,32 mm  $\times$  0,25  $\mu$ m) (SGE Analytical Science Pty Ltd., Australia) con elio come gas di trasporto, flusso costante di 2 ml/min. I cromatogrammi e gli spettri di massa sono stati valutati con il programma CHROMATOF (LECO, St. Joseph, MI). I metaboliti sono stati identificati mediante confronto con una libreria personalizzata realizzata con standard commerciali.

### 3.1.11 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati mediante test parametrici ed utilizzando il *software* SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versione 28. È stata effettuata l'analisi ANOVA ad una via e successivo test t di Student per effettuare un confronto fra i genotipi. L'analisi dei metaboliti primari è stata eseguita con MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>), consultato il 13 dicembre 2022, per ottenere una *heat map*. La percentuale di variazione è stata calcolata utilizzando la seguente formula:

Aumento o diminuzione (%) = [(valore del genotipo testato – valore del genotipo WT)  $\times$  valore del genotipo WT $^{-1}$ ]  $\times$  100

## 3.2 Risultati

In questo elaborato di tesi è stato effettuato una caratterizzazione genotipica e fenotipica di mutanti *knock-out* ottenuti tramite la tecnica di *genome editing* CRISPR/Cas9 per identificare i geni candidati responsabili dell'accumulo di acido ascorbico (AsA) nei frutti di pomodoro.

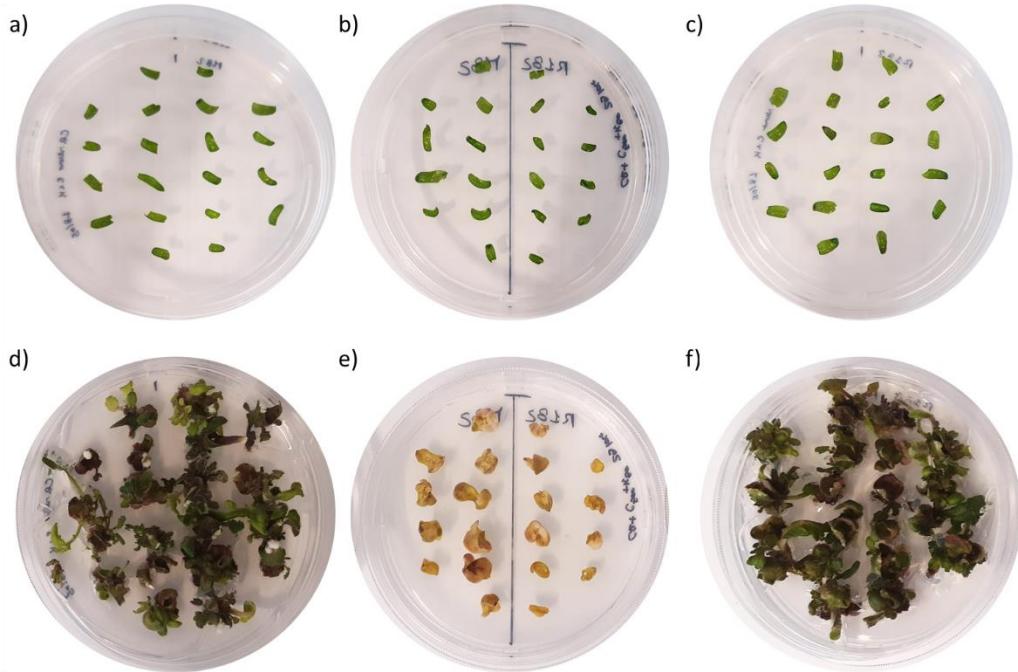
Per la trasformazione genetica, considerando i risultati ottenuti dalle analisi delle diverse sublinee di *S.pennellii* testate (Capitolo 2), è stata utilizzata la sublinea R182. Questa sublinea proviene dall'incrocio tra la linea d'introgressione 7-3 di *S.pennellii* con il genotipo *S. lycopersicum* cv. M82 ed è stata selezionata per le sue migliori *performance* in termini di resa e di qualità dei frutti.

Tra tutti i geni mappati nella regione di introgressione di R182, è stata focalizzata l'attenzione su due geni codificanti per un *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT) e per una *Major Facilitator Superfamily Protein* (MFSP), che potrebbero svolgere un ruolo indiretto nella biosintesi e nell'accumulo di AsA e nel controllo di altri tratti qualitativi chiave tra cui °Brix.

### 3.2.1 Prova di rigenerazione

Nessuno studio precedente riportava la trasformazione della sublinea R182, quindi, prima di procedere alla trasformazione genetica è stata effettuata una prova di rigenerazione utilizzando il protocollo descritto nel paragrafo 3.1.4.

Come evidenziato dalla Figura 3.3, la sublinea R182 non ha presentato difficoltà di rigenerazione. Come atteso, sul terreno di coltura a cui sono stati aggiunti gli antibiotici selettivi non è stata invece ottenuta rigenerazione. Questa analisi ha confermato che la sublinea R182 può essere utilizzata per la trasformazione genetica tramite *A. tumefaciens*.



**Figura 3.3.** Prova di rigenerazione della sublinea R182 con il controllo M82. a) cotiledoni di M82 e c) R182 a tempo 0, b) cotiledoni di M82 (sinistra) e R182 (destra) a tempo 0 su terreno di coltura con gli antibiotici selettivi, d) cotiledoni di M82 e f) R182 dopo 43 giorni, e) cotiledoni di M82 e R182 dopo 43 giorni su terreno di coltura con gli antibiotici selettivi.

### 3.2.2 Genotipizzazione delle piante T<sub>0</sub>

Per la trasformazione genetica della sublinea R182 sono stati impiegati un totale di 330 cotiledoni di cui 152 trasformati con il plasmide pKSE401NATg02 per l'*editing* del gene NAT e 178 trasformati con il plasmide pKSE401MFSPg60 per l'*editing* del gene MFSP. Seguendo il protocollo di trasformazione riportato al paragrafo 3.1.4 sono stati ottenuti 100 germogli per il gene NAT e 88 germogli per il gene MFSP. Solo le piante ben radicate su mezzo selettivo sono state trasferite in serra e analizzate tramite PCR e sequenziamento (Figura 3.4).



**Figura 3.4.** Piante T<sub>0</sub> ottenute dalla trasformazione genetica dei cotiledoni.

Delle 60 piante ottenute dalla trasformazione con il plasmide pKSE401NATg02, 16 piante sono risultate Cas9 positive e tra queste 6 erano editate (linee bialleliche con delezioni -4/-6 bp, -3/-4 bp e -5/-8 bp). Per il gene MFSP sono state analizzate 36 piante di cui 22 sono risultate Cas9 positive e, tra queste, 5 editate (linee bialleliche con inserzioni +1 bp A/T, delezione -4/-7 bp, inserzione di +1 bp (T) e una delezione -80 bp) (Tabella 3.4).

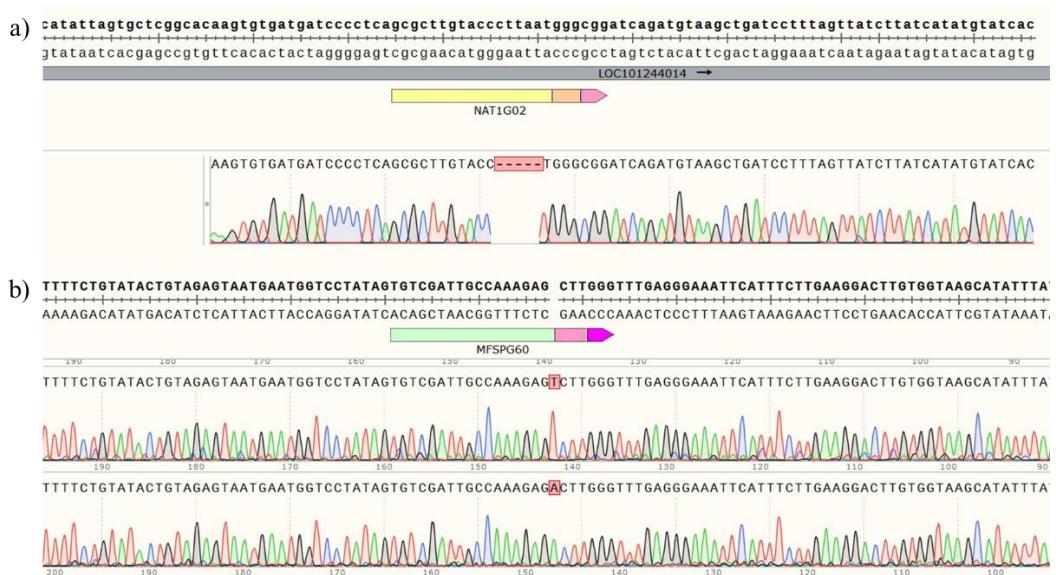
**Tabella 3.4.** Trasformazione di R182 con il gene NAT e MFSP.

Gene	NAT	MFSP
<b>Cotiledoni trasformati</b>	152	178
<b>Germogli rigenerati</b>	100	88
<b>Cas9 positive</b>	16	22
<b>Piante editate</b>	6	5
<b>% di trasformazione</b>	10,6	12,36

### 3.2.3 Genotipizzazione della generazione T<sub>1</sub>

Per studiare i potenziali effetti delle mutazioni nelle piante trasformate, sono state selezionate 3 piante editate per ciascun gene. I semi provenienti dalle linee selezionate T<sub>0</sub> e i rispettivi genotipi non trasformati (*wild type*) sono stati fatti germinare in contenitori alveolari in polistirolo in ambiente controllato. Al termine dello *screening* le piante sono state trasferite in vasi di plastica ed allevate in serra presso il Centro Ricerche Metapontum Agrobios – Agenzia Lucana per lo Sviluppo e l’Innovazione in Agricoltura (ALSIA).

Dalla semina delle piante editate selezionate sono state analizzate 24 piante per il gene NAT e 53 piante per il gene MFSP tramite PCR e sequenziamento (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Esempio di un chromatogramma analizzato con il software SnapGene. a) delezione di 5 bp per il gene NAT; b) inserzione di 1 bp (T/A) per il gene MFSP.

Tra le linee T<sub>1</sub> trasformate con il costrutto pKSE401NATg02 sono state ottenute 12 linee bialleliche e 12 linee omozigoti (delezioni -3, -4, -5, -6 e -8 bp) (Tabella 3.5) di cui 4 linee Cas9 negative. Tra le linee T<sub>1</sub> trasformate con il costrutto pKSE401MFSPg60 sono state ottenute 33 linee bialleliche, 20 linee omozigoti (inserzioni base T e base A, delezioni -4 e -7 bp) (Tabella 3.6) di cui 9 linee Cas9 negative.

**Tabella 3.5.** Mutazione in generazione T<sub>1</sub> del gene NAT.

N° piante	Mutazione	Allele 1	Allele 2	Cas9
9	Biallelica	-5 bp	-8 bp	+
1	Biallelica	-5 bp	-8 bp	-
4	Omozigote	-5 bp	-5 bp	+
1	Omozigote	-5 bp	-5 bp	-
1	Omozigote	-8 bp	-8 bp	+
1	Biallelica	-6 bp	-4 bp	+
1	Biallelica	-6 bp	-4 bp	-
1	Omozigote	-6 bp	-6 bp	+
1	Omozigote	-6 bp	-6 bp	-
1	Omozigote	-4 bp	-4 bp	+
2	Omozigote	-3 bp	-3 bp	+
1	Omozigote	-4 bp	-4 bp	+

**Tabella 3.6.** Mutazione in generazione T<sub>1</sub> del gene MFSP.

N° piante	Mutazione	Allele 1	Allele 2	Cas9
10	Biallelica	+1 bp (A)	+1 bp (T)	+
4	Biallelica	+1 bp (A)	+1 bp (T)	-
3	Omozigote	+1 bp (A)	+1 bp (A)	+
1	Omozigote	+1 bp (T)	+1 bp (T)	+
1	Omozigote	+1 bp (T)	+1 bp (T)	-
8	Biallelica	-4 bp	-7 bp	+
1	Biallelica	-4 bp	-7 bp	-
6	Omozigote	-4 bp	-4 bp	+
4	Omozigote	-7 bp	-7 bp	+
1	Omozigote	-7 bp	-7 bp	-
2	Biallelica	+1 bp (T)	-81 bp	-
8	Biallelica	+1 bp (T)	-81 bp	+
4	Omozigote	+1 bp (T)	+1 bp (T)	+

Il *tool* online Clustal Omega è stato utilizzato per verificare l'effetto delle mutazioni sulla traduzione delle proteine corrispondenti. Come mostrato in Figura 3.6, a, per il gene NAT la delezione di 4, 5 e 8 bp bloccava la formazione della proteina, mentre la delezione di 3 e 6 bp non influenzava la traduzione. Per il gene MFSP (Figura 3.6, b), per tutti gli eventi di mutazione ottenuti (inserzione di T o A,

delezione di 4 e 7 bp), la traduzione della proteina era bloccata, tranne che per la delezione di 81 bp in cui la proteina era tradotta ma non era completa.

In base ai risultati ottenuti da quest'ultima analisi, sono state scelte le piante editate da allevare in serra e sottoporre a ulteriori analisi.

a)	S_lyc_NAT R182_A2_27_102_prot(5bpdel) R182_A2_27_95_prot(8bpdel) R182_A2_32_107_prot(4bpdel) R182_A2_32_106_prot(6bpdel) R182_A2_85_109_prot(4bpdel) R182_A2_85_110_prot(3bpdel)	MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPLMGGSD MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPGIRWG MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALV-GRIRWG MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPWADQMG MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPWADQMG MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPWADQMG MTMADISHPPMEQLQDLEYCIDSNSPPWETILLAFQNYILVLGTSVMIPSALVPL-GGSD ***** .	60 60 59 60 58 60 59
	S_lyc_NAT R182_A2_27_102_prot(5bpdel) R182_A2_27_95_prot(8bpdel) R182_A2_32_107_prot(4bpdel) R182_A2_32_106_prot(6bpdel) R182_A2_85_109_prot(4bpdel) R182_A2_85_110_prot(3bpdel)	GDKARVIQTLLFVAGINTLLQALFGTRLPAVVGGSFAYV-IPIVYIISDSHLQRISDPHV QSKGVTNATLC--GWNKYT-----SPSIVWNSVARCCWRFLCICHSYSLYN----- QSKGVTNATLC--GWNKYT-----SPSIVWNSVARCCWRFLCICHSYSLYN----- TKQGLYKRYSLWLE----- GDKARVIQTLLFVAGINTLLQALFGTRLPAVVGGSFAYV-IPIVYIISDSHLQRISDPHV TKQGLYKRYSLWLE----- GDKARVIQTLLFVAGINTLLQALFGTRLPAVVGGSFAYV-IPIVYIISDSHLQRISDPHV ... 119 104 103 74 117 74 118	119 104 103 74 117 74 118
	S_lyc_NAT R182_A2_27_102_prot(5bpdel) R182_A2_27_95_prot(8bpdel) R182_A2_32_107_prot(4bpdel) R182_A2_32_106_prot(6bpdel) R182_A2_85_109_prot(4bpdel) R182_A2_85_110_prot(3bpdel)	RFVHTMRAlIQQGALIVAASIQQILGYSQVWGLFSRFFSPLGMAPVVGLVGFLFQRGFPAL ----- ----- ----- ----- RFVHTMRAlIQQGALIVAASIQQILGYSQVWGLFSRFFSPLGMAPVVGLVGFLFQRGFPAL ----- 74 177 178	179 104 103 74 177 74 178
b)	S_pennellii_MFSP_prot R182_A3_5_4_prot(Tins) R182_A3_5_13_prot(Ains) R182_A3_9_6_prot(7bpdel) R182_A3_9_7_prot(4bpdel) R182_A3_16_17_prot(Tins) R182_A3_16_29L_prot(81bpdel)	MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE MQQALAIHSLQCFSTTNFHRKHHYFDHLRNRKQYPFPFLTSFSVSKEVKVSASSKQKPPE ***** .	60 60 60 60 60 60 60
	S_pennellii_MFSP_prot R182_A3_5_4_prot(Tins) R182_A3_5_13_prot(Ains) R182_A3_9_6_prot(7bpdel) R182_A3_9_7_prot(4bpdel) R182_A3_16_17_prot(Tins) R182_A3_16_29L_prot(81bpdel)	VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA VESVIGDDEDGLLLEKVIWVDDGDLGWLPAFPHVLIASMANFLFGYHIGVMNGPIVIA ***** .	120 120 120 120 120 120 113
	S_pennellii_MFSP_prot R182_A3_5_4_prot(Tins) R182_A3_5_13_prot(Ains) R182_A3_9_6_prot(7bpdel) R182_A3_9_7_prot(4bpdel) R182_A3_16_17_prot(Tins) R182_A3_16_29L_prot(81bpdel)	KELGFEGNSFLEGLVVSIFIGGAFIGSITCGSLVDKLGCCRTIQFDTVPLILGAIWSAQ KE-SWV----- KE-TWV----- -L-GLREIHFLKDLW----- KE-GLREIHFLKDLW----- KE-SWV----- -----GGAFIGSITCGSLVDKLGCCRTIQFDTVPLILGAIWSAQ 180 125 125 133 134 125 153	180 125 125 133 134 125 153

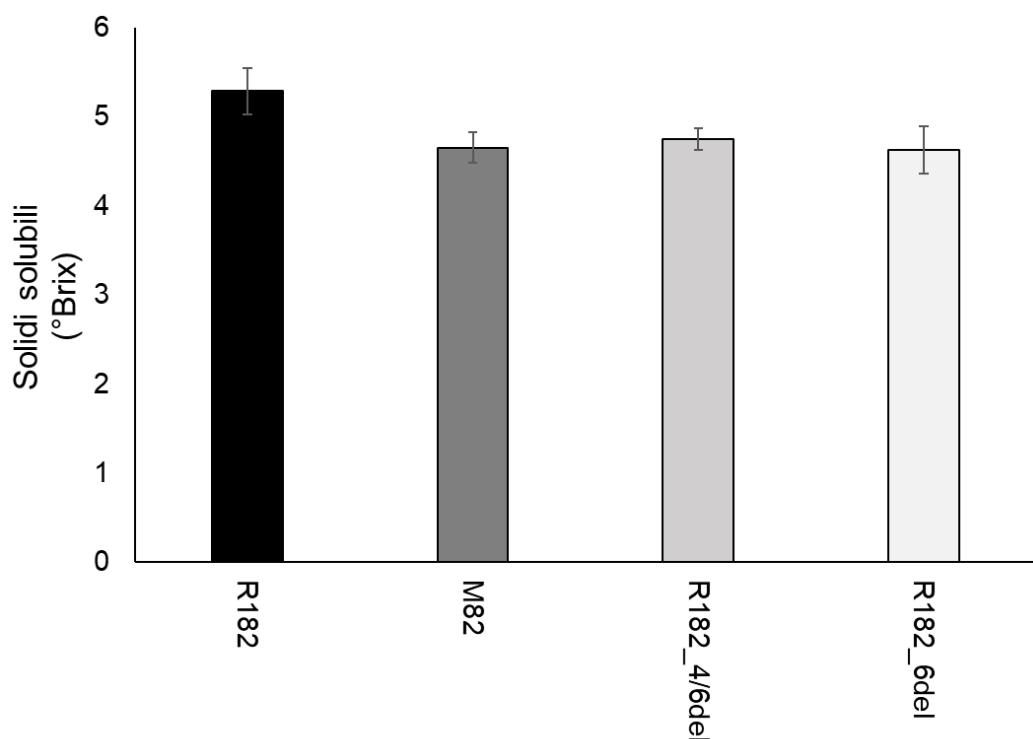
**Figura 3.6.** Allineamento delle sequenze proteiche, ottenute con il software SnapGene, delle piante mutate T<sub>1</sub> con la regione target. a) gene NAT, b) gene MFSP.

### 3.2.4 Analisi qualitative

I frutti ottenuti dalle piante mutate  $T_1$  selezionate per entrambi i geni sono stati utilizzati per una preliminare analisi qualitativa e metabolomica.

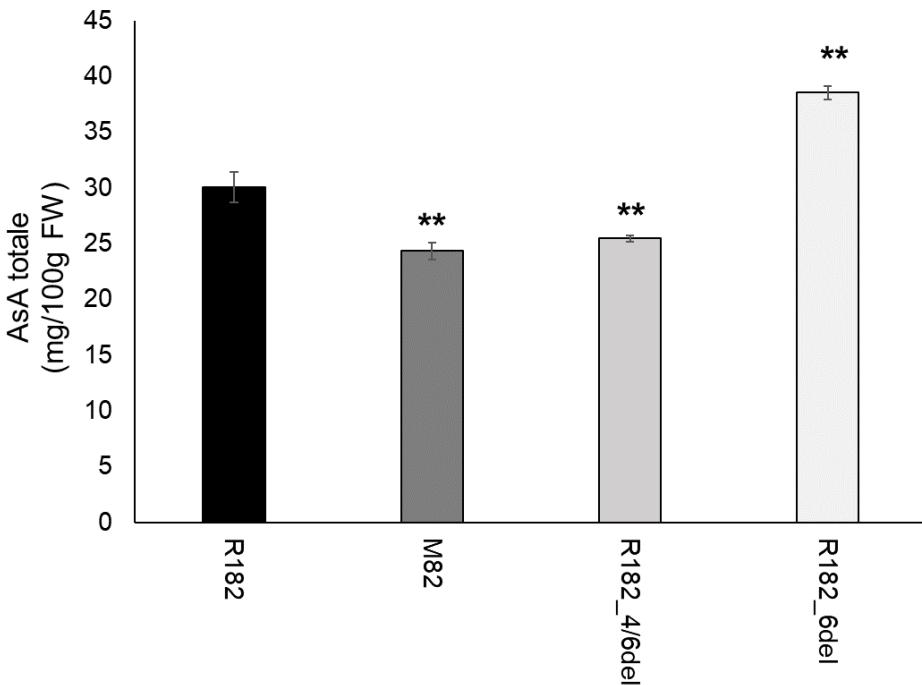
#### *Analisi delle piante con il gene NAT editato*

Nei frutti delle piante NAT edite, con una delezione di 4/6 bp, nessuna differenza statisticamente significativa è stata registrata nel contenuto totale di solidi solubili rispetto al genotipo R182 (Figura 3.7).



**Figura 3.7.** Contenuto di solidi solubili (°Brix) nei frutti delle piante mutate per il gene NAT, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

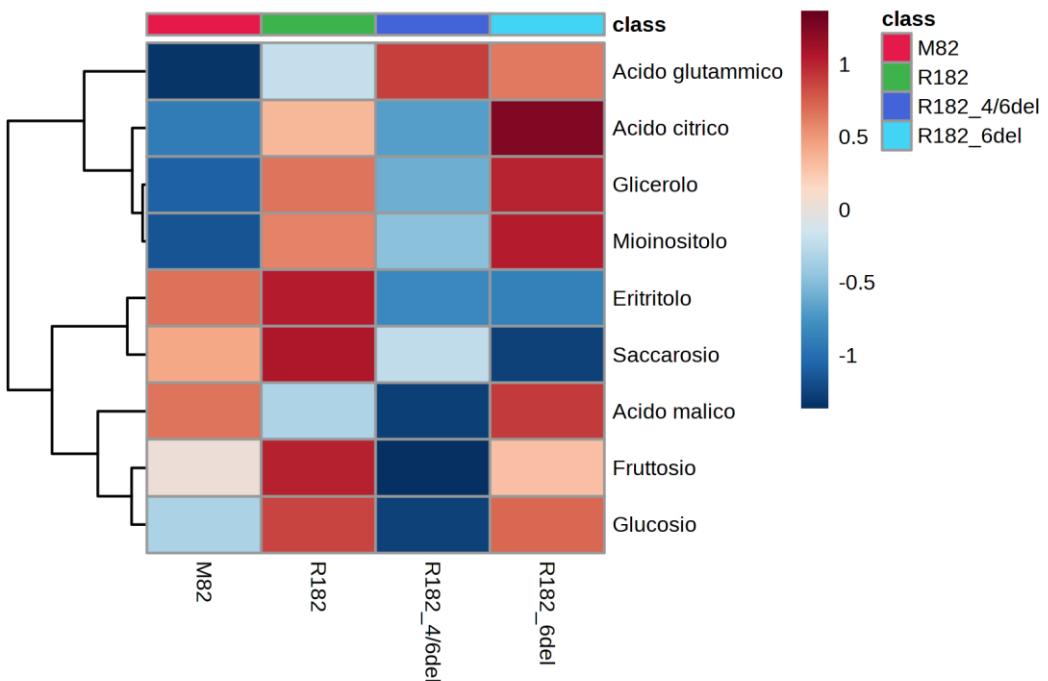
Per quanto concerne il contenuto di acido ascorbico totale è stato registrato un incremento (+28%) rispetto al genotipo *wild type* solo nei frutti della pianta R182 con una delezione di 6 paia di basi. Un significativo decremento, invece, è stato registrato nel parentale M82 (-19%) e nel mutante con una delezione di 4/6 paia di basi R182\_4/6del (-15%) (Figura 3.8).



**Figura 3.8.** Contenuto di acido ascorbico nei frutti delle piante mutate  $T_1$  per il gene NAT, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Il contenuto dei diversi metaboliti primari è stato rappresentato tramite *heat map* (Figura 3.9), dove come variabili (colonne) sono stati riportati i genotipi e come osservazioni (righe) i diversi metaboliti rilevati.

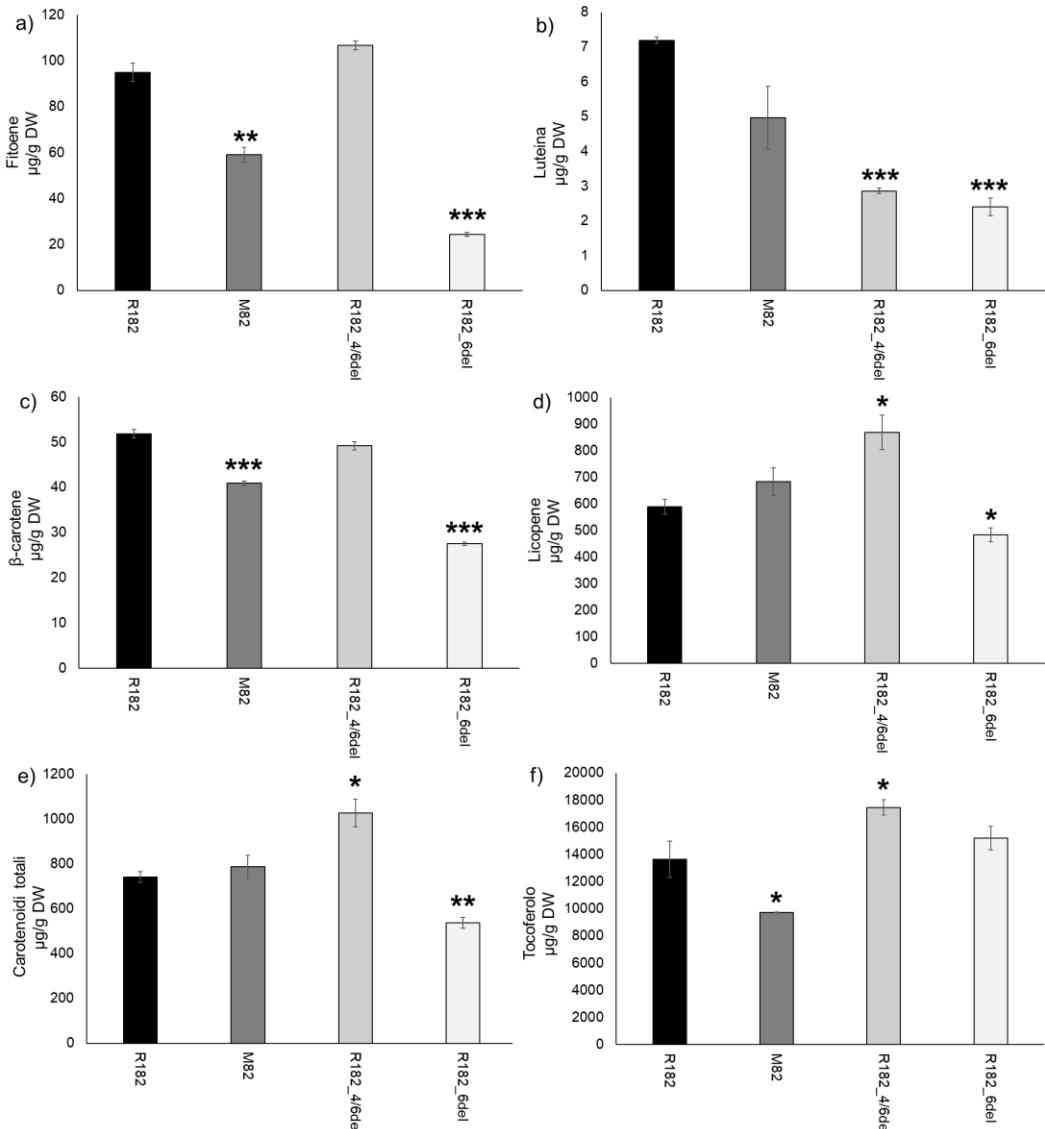
Tramite *heat map* è stato possibile visualizzare la concentrazione dei diversi metaboliti rispetto al controllo non trasformato R182 e al parentale M82. Il genotipo R182 non trasformato mostra una concentrazione di fruttosio e glucosio maggiore rispetto al parentale M82 e ai due mutanti. Entrambe le mutazioni dei due genotipi editati hanno condotto ad un minor accumulo di zuccheri nei frutti. In particolare, la delezione di 4/6 paia di basi nel mutante R182 presenta la concentrazione più bassa di metaboliti primari sia rispetto al *wild type* R182 che rispetto al parentale M82. È interessante notare che tra i metaboliti che si ritrovano in concentrazione minore nei genotipi editati sono i principali precursori di acido ascorbico, quali glucosio, fruttosio, saccarosio e mioinositolo (Figura 3.9).



**Figura 3.9.** Heat map ottenuta dall’analisi dei metaboliti primari nei frutti delle piante mutate per il gene NAT, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. La figura è stata generata utilizzando il pacchetto di programmi <https://www.metaboanalyst.ca/> (accesso il 13 dicembre 2022).

Relativamente alla quota di antiossidanti lipofili, la nostra analisi si è focalizzata sul contenuto dei diversi carotenoidi nei frutti delle piante mutate (Figura 3.10).

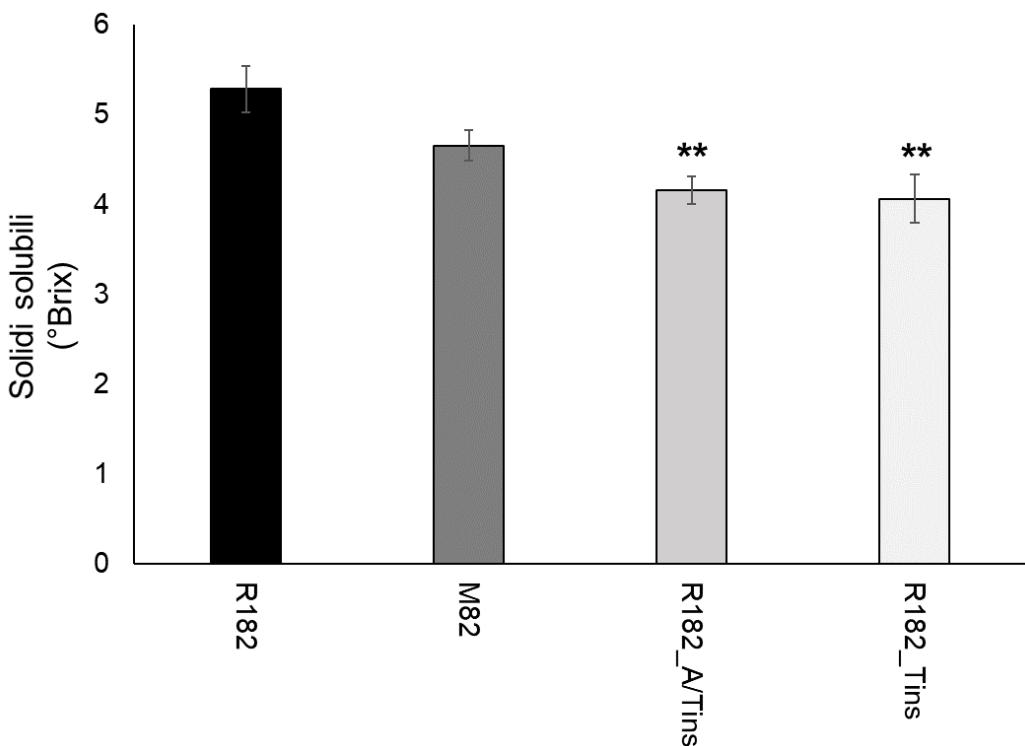
In particolare, la pianta R182\_4/6del ha mostrato il più alto contenuto di licopene ( $868,54 \pm 111,12 \text{ } \mu\text{g/g DW}$ ), carotenoidi totali ( $1027,22 \pm 106,97 \text{ } \mu\text{g/g DW}$ ) e tocoferolo ( $177449,72 \pm 971,94 \text{ } \mu\text{g/g DW}$ ) rispetto a tutti i campioni analizzati. Al contrario, la pianta mutata R182\_6del ha mostrato per gli stessi carotenoidi totali e licopene la più bassa concentrazione, riportando, inoltre, un significativo decremento anche per la quota di  $\beta$ -carotene rispetto al controllo R182 e M82.



**Figura 3.10.** Contenuto totale a) fitoene b) luteina c)  $\beta$ -carotene d) lycopene e) carotenoidi totali f) tocoferolo nei frutti delle piante mutate del gene NAT, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

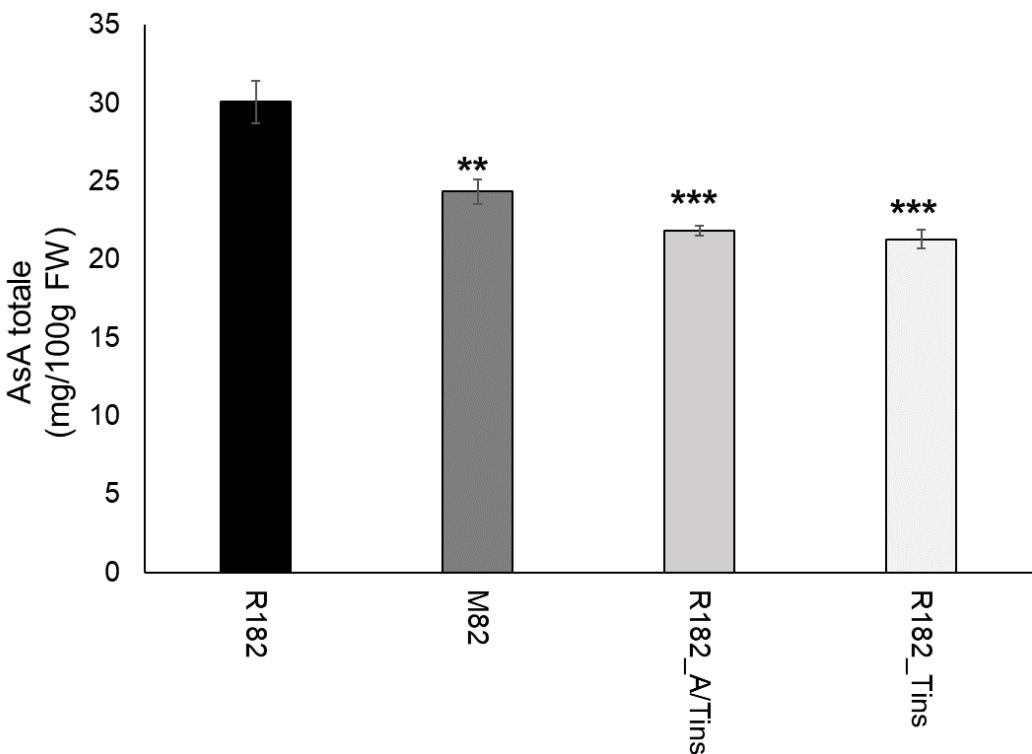
#### Analisi delle piante con il gene MFSP editato

Nelle piante editate con il gene MFSP si è osservato una variazione del livello di solidi solubili nella bacca rispetto alle piante non trasformate. Il livello dei °Brix nei frutti delle piante editate rispetto al controllo non trasformato ha mostrato un decremento del 21% nella pianta biallelica con inserzione A/T e del 23% per il mutante omozigote con un'inserzione della base T (Figura 3.11).



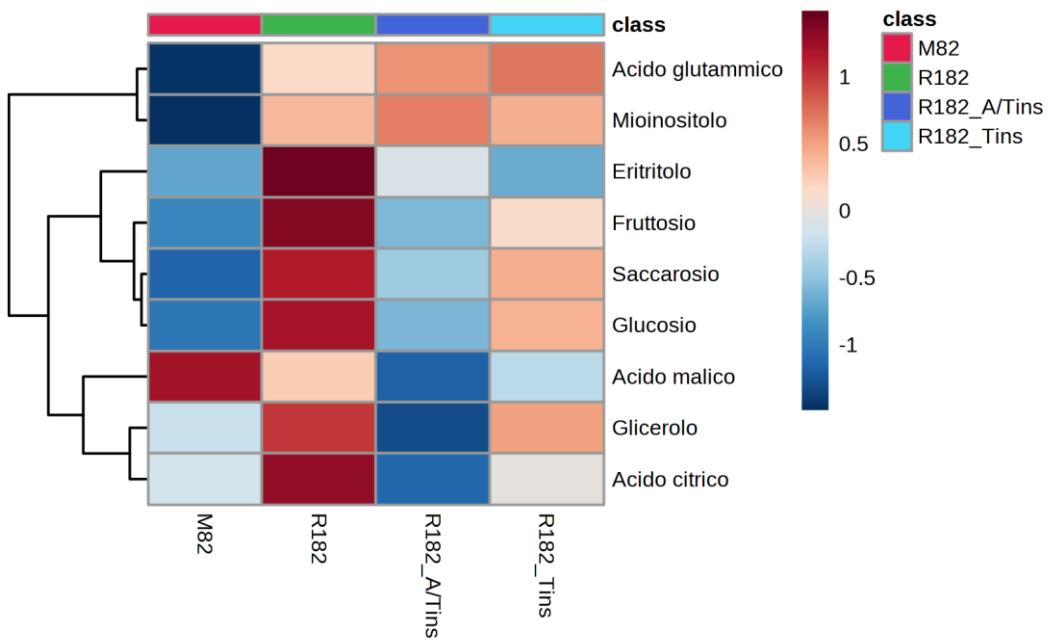
**Figura 3.11.** Contenuto di solidi solubili (°Brix) nei frutti delle piante mutate per il gene MFSP, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Per il contenuto di acido ascorbico si è avuto un generale decremento in tutti i campioni analizzati rispetto alla sublinea R182. In particolare, la pianta editata con un'inserzione A/T ha riportato un decremento rispetto alla linea non mutata R182 del 27%, mentre un decremento del -29% è stato registrato in R182\_Tins (Figura 3.12).



**Figura 3.12.** Contenuto di acido ascorbico nei frutti delle piante T<sub>1</sub> mutate per il gene MFSP, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

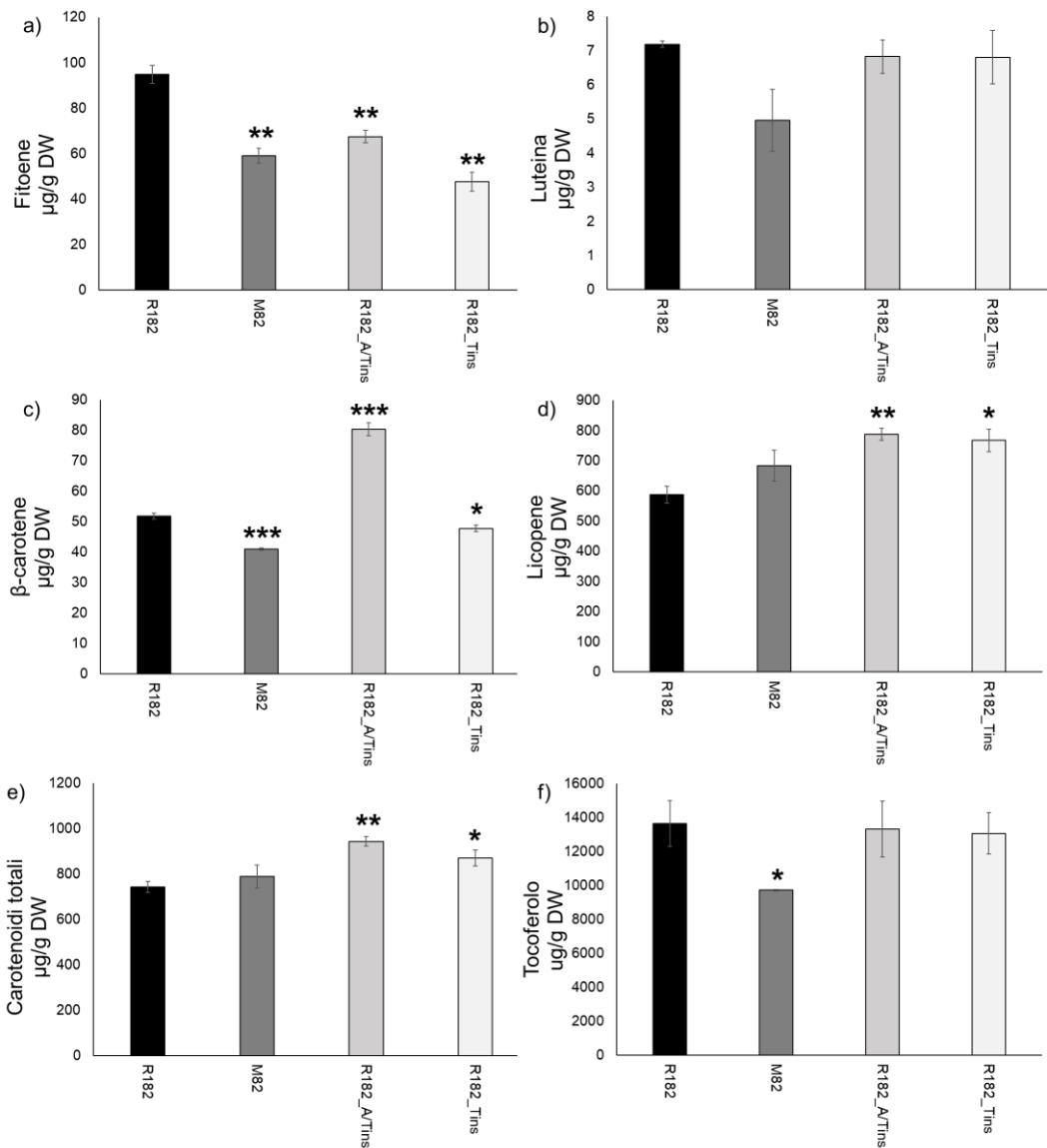
Questo stesso andamento è stato confermato anche dall'analisi dei metaboliti primari, rappresentata tramite un grafico *heat map* (Figura 3.13). Rispetto al genotipo *wild type* R182, entrambe le linee editate hanno riportato concentrazioni inferiori di zuccheri. Nella fattispecie, R182\_A/Tins ha riportato livelli più bassi di zuccheri quali glucosio, saccarosio, fruttosio ed eritritolo rispetto alle altre linee. Mentre per il metabolita mioinositolo non sono state evidenziate concentrazioni differenti tra le piante editate e la linea *wild type* R182. Al contrario solo il genotipo M82 ha mostrato una diminuzione significativa del suddetto composto.



**Figura 3.13.** Heat map ottenuta dall’analisi dei metaboliti primari nei frutti delle piante  $T_1$  mutate per il gene MFSP, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. La figura è stata generata utilizzando il pacchetto di programmi <https://www.metaboanalyst.ca/> (accesso il 13 dicembre 2022).

Le analisi dei carotenoidi nelle piante mutate per il gene MFSP hanno mostrato un generale incremento per tutti i carotenoidi analizzati; eccezione fatta per il fitoene, unico parametro a decrescere (Figura 3.14). Risulta invariato il contenuto di luteina e di tocoferolo tra tutte le piante analizzate.

La pianta R182\_A/Tins ha mostrato in assoluto la concentrazione maggiore di  $\beta$ -carotene, licopene e carotenoidi totali rispetto alle altre linee analizzate. Riportando, un incremento del 55% di  $\beta$ -carotene, del 34% di licopene e del 27% di carotenoidi totali rispetto alla sottolinea R182.



**Figura 3.14.** Contenuto totale a) fitoene b) luteina c)  $\beta$ -carotene d) licopene e) carotenoidi totali f) tocoferolo nei frutti delle piante  $T_1$  mutate per il gene MFSP, delle piante *wild type* R182 e il parentale M82. I valori sono le medie  $\pm$ SE. Le differenze tra i diversi genotipi sono state valutate con il test t di Student (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001).

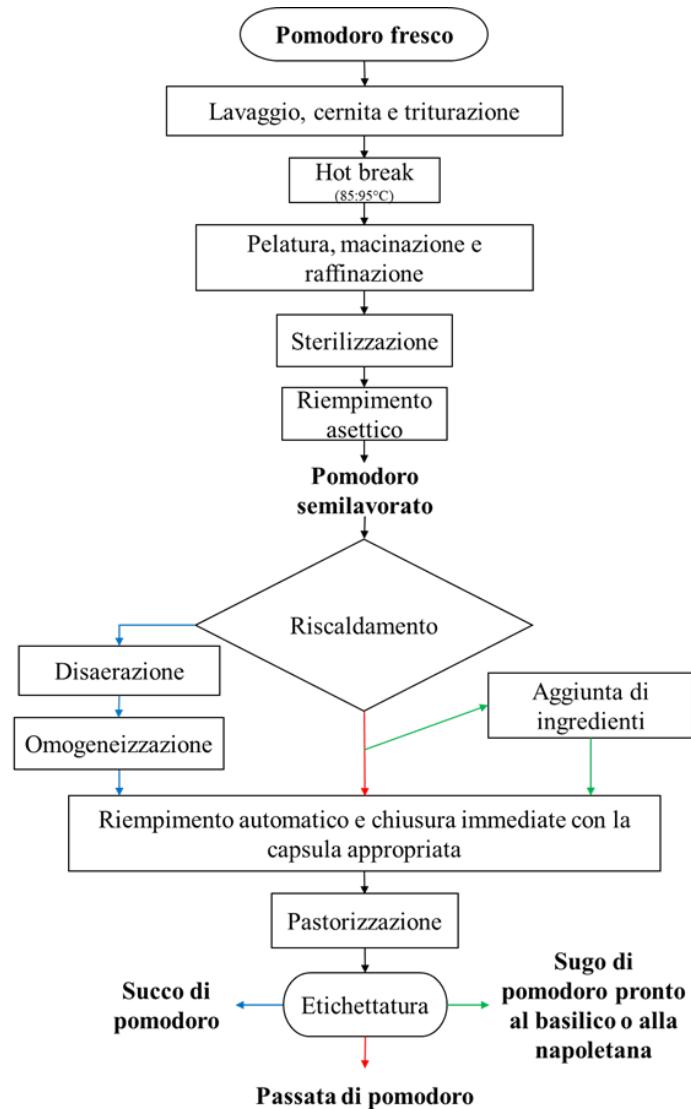
## **4 Caratterizzazione dei sottoprodotti della filiera del pomodoro**

---

## 4.1 Materiali e metodi

### 4.1.1 Processo di lavorazione dei sottoprodotti del pomodoro

I campioni utilizzati in questo studio sono stati forniti dall'industria BioItalia, Area PIP Sarno (Salerno, Italia). Tutti i campioni provengono dallo stesso loto di pomodori freschi biologici e sono stati processati come riportato nella Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Diagramma di flusso del processo di trasformazione del pomodoro adottato dall'azienda BioItalia. I prodotti utilizzati in questo studio sono evidenziati in grassetto. Le frecce nere indicano le fasi di produzione comuni. Le frecce colorate indicano le diverse fasi a seconda del prodotto da ottenere.

Nel dettaglio verranno descritti i sottoprodotti analizzati nel seguente elaborato di tesi (Figura 4.2).

*Pomodoro fresco:*

Come controllo è stata utilizzata la varietà Docet di pomodoro utilizzata dall'azienda per la trasformazione. Docet è una cultivar di media vigoria caratterizzata da internodi corti ed elevato potenziale produttivo. I frutti hanno una forma a pera con un peso medio di 75-80 grammi (*Vegetables Bayer*, 2022). Le piante sono state coltivate in pieno campo a Cerignola (Foggia, Puglia, Italia) nel 2020. La raccolta della produzione è avvenuta meccanicamente e una prima selezione della materia prima è stata effettuata con l'uso di sensori ottici. Poche ore dopo la raccolta, dopo le analisi preliminari, i pomodori sono stati lavorati secondo un trattamento termico classico per garantirne il sapore, il profumo e la fragranza.

*Pomodoro semilavorato:*

Questo prodotto è realizzato dall'azienda Coppola SpA di Scafati (Salerno, Italia) per BioItalia. È un semilavorato ottenuto dalla spremitura di pomodori freschi e maturi privi di bucce e semi. Viene confezionato in sacchetti asettici con scatole e lasciato nei magazzini fino al momento dell'utilizzo.

*Passata di pomodoro:*

Dopo un breve riscaldamento del pomodoro semilavorato a 85 °C, il riempimento automatico avviene in bottiglie di vetro e subito chiuse con l'apposita capsula. I vasetti riempiti vengono pastorizzati, etichettati e si ottiene così la passata di pomodoro, pronta per la commercializzazione.

*Sugo di pomodoro pronto al basilico o alla napoletana:*

In questo sugo gli ingredienti vengono aggiunti alla passata di pomodoro prima di essere imbottigliata a seconda del sugo che si vuole ottenere. Per il sugo al basilico si aggiungono olio extravergine di oliva, basilico (2%), sale marino e aglio. Per il sugo alla napoletana vengono aggiunti olio extravergine di oliva, sale, cipolla (0,7%), aglio (0,07%), origano (0,07%), basilico (0,07%).

Le salse sono pastorizzate, etichettate e pronte per la commercializzazione.

*Succo di pomodoro:*

Prima di riempire le bottiglie, la passata di pomodoro viene sottoposta a due trattamenti: disaerazione e omogeneizzazione. Successivamente avvengono:

imbottigliamento, pasteurizzazione ed etichettatura e si ottiene così il succo di pomodoro da bere.



**Figura 4.2.** I sottoprodotti analizzati: a) pomodoro fresco, b) pomodoro semilavorato; c) passata di pomodoro; d) sugo al basilico; e) sugo alla napoletana; f) succo di pomodoro.

### 4.1.2 Tratti qualitativi

Per ogni prodotto sono stati valutati il contenuto di solidi solubili (SSC), il pH e l'acidità titolabile (TA).

Il contenuto di solidi solubili è stato misurato come °Brix nel succo omogeneizzato da frutta matura con un rifrattometro (Hanna). Il pH è stato misurato con un pH-metro (Mettler-Toledo, Milano, Italia) e l'acidità titolabile è stata determinata titolando 5 g di prodotto centrifugato con una soluzione 0,1 N di idrossido di sodio.

#### **4.1.2.1 Determinazione del contenuto totale dei carotenoidi, licopene e $\beta$ -carotene**

La valutazione dei carotenoidi totali, del licopene e del  $\beta$ -carotene è stata effettuata mediante un saggio colorimetrico su campioni finemente macinati secondo il metodo riportato da Wellburn (1994) e Zouari et al. (2014) con modifiche di Rigano et al. (2016).

Per ottenere l'estratto lipofilo, 500 mg di polvere di campione congelato sono stati estratti con 32 mL di acetone/esano (40/60, v/v). La miscela è stata agitata a 300 rpm per 20 minuti e poi centrifugato a 5000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Questa procedura è stata ripetuta per tre volte consecutive e il surnatante è stato raccolto in un tubo Falcon da 50 mL. Sono state misurate tre repliche separate per ogni campione e tre repliche tecniche per ogni ripetizione biologica. L'assorbanza degli estratti lipofili è stata letta a 470 nm per i carotenoidi, a 505 e 453 nm per il licopene e il  $\beta$ -carotene rispettivamente, con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania). I carotenoidi totali, il licopene e il  $\beta$ -carotene sono stati determinati mediante l'equazione riportata da Wellburn (1994). La concentrazione è stata espressa come mg/100 g di peso fresco (FW).

#### **4.1.2.2 Determinazione del contenuto di fenoli totale**

L'estrazione della frazione idrofila è stata effettuata secondo il test di Folin – Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) e Marinova et al. (2005) con piccole modifiche.

In breve, il tessuto macinato congelato (250 mg) è stato pesato, posto in un mortaio e con l'aiuto di un pestello i fenoli sono stati estratti con 1 mL di metanolo al 60%. Gli estratti sono stati trasferiti in un tubo Falcon da 15 mL e il volume è stato portato a 5 ml aggiungendo metanolo al 60%. I campioni sono stati centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4 °C e il surnatante è stato conservato a -20 °C fino all'analisi dei composti fenolici totali. Per ogni campione sono state misurate tre repliche biologiche separate e per ogni replica biologica sono state eseguite tre repliche tecniche. In una Eppendorf da 2 mL sono stati miscelati 62,5  $\mu$ l di surnatante, 62,5  $\mu$ l di reattivo di Folin - Ciocalteu (Sigma, St. Louis, MO,

USA) e 250 µl di acqua deionizzata e sono stati incubati per 6 minuti al buio; successivamente sono stati aggiunti 625 µl di carbonato di sodio al 7,5% e 500 µl di acqua deionizzata e sono stati incubati per 90 minuti a temperatura ambiente al buio. L'assorbanza è stata misurata a 760 nm con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania) utilizzando come riferimento il metanolo al 60%. La concentrazione di fenoli totali è stata espressa come mg GAE (acido gallico equivalente) /100 g di peso fresco (FW).

#### **4.1.2.3 Attività antiossidante**

La determinazione dell'attività antiossidante lipofila (LAA) e idrofila (HAA) è stata eseguita secondo il metodo dell'acido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-solfonico) (ABTS) (Miller & Rice-Evans, 1997; Re et al., 1999) utilizzando gli estratti lipofili e idrofili ottenuti come descritto nei paragrafi 4.1.2.1 e 4.1.2.2 rispettivamente. È stata preparata una soluzione costituita da 7,4 mM di ABTS mescolata con 140 mM di persolfato di potassio ( $K_2S_2O_8$ ) e stabilizzata per 12 ore. Questa miscela è stata diluita mescolando la soluzione di ABTS<sup>+</sup> con etanolo (1:88) per ottenere un'assorbanza di  $0,70 \pm 0,10$  unità a 734 nm mediante uno spettrofotometro. Gli estratti lipofili e idrofili (100 µL) sono stati lasciati reagire con 1 mL di soluzione ABTS<sup>+</sup> diluita per 2,5 min. L'assorbanza è stata rilevata a 734 nm da un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania). Tutte le repliche biologiche dei campioni sono state analizzate in triplicato. I risultati sono stati espressi come micromoli di TE (trolox equivalente) per 100 g FW.

#### **4.1.2.4 Determinazione del contenuto di acido ascorbico**

La determinazione dell'acido ascorbico (AsA) è stata eseguita con un metodo colorimetrico (Stevens et al., 2006) con modifiche riportate da Rigano et al. (2014).

Brevemente, 500 mg di polvere di prodotto congelato sono stati estratti con 300 µl di acido tricloroacetico (TCA) freddo al 6%. La miscela è stata agitata, incubata per 15 minuti in ghiaccio e centrifugata a 14000 rpm per 20 minuti a 4 °C. Sono stati aggiunti a 20 µl di campione, 20 µl di ditiotreitolo 5 mM in *buffer* fosfato 0,4 M (pH 7,4) e la miscela è stata incubata per 20 minuti a 37 °C. Sono stati aggiunti 10 µl di N-etil maleimmide (NEM; 0,5% (w/v) in acqua) e lasciati per 1 minuto a

temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 80  $\mu$ l di soluzione di reazione colorante (CR). Questa soluzione è stata preparata mescolando la soluzione A [31% (w/v)  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (acido fosforico), 4,6% (w/v) TCA e 0,6% (w/v)  $\text{FeCl}_3$  (cloruro ferrico)] con la soluzione B [4% (w/v) 2,2'-dipiridile (in etanolo al 70%)]. La miscela finale è stata incubata a 37 °C per 40 minuti e misurata a 525 nm con un NanoPhotometer<sup>TM</sup> (Implen, Monaco, Germania) utilizzando il 6% di TCA come riferimento. Sono state misurate tre repliche separate per ogni campione e tre repliche tecniche per ogni ripetizione biologica. La concentrazione è stata espressa in mg/100 g di peso fresco (FW).

#### **4.1.3 Analisi statistica**

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza utilizzando un'ANOVA a una via. Per separare le medie all'interno di ciascun parametro, è stato eseguito il test di Duncan. Le differenze di  $p < 0,05$  sono state considerate significative. L'ANOVA è stata eseguita utilizzando il pacchetto 6 di SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versione 28. L'*heat map* è stata generata utilizzando il pacchetto di programmi <https://biit.cs.ut.ee/clustvis/> (accesso il 25 ottobre 2022).

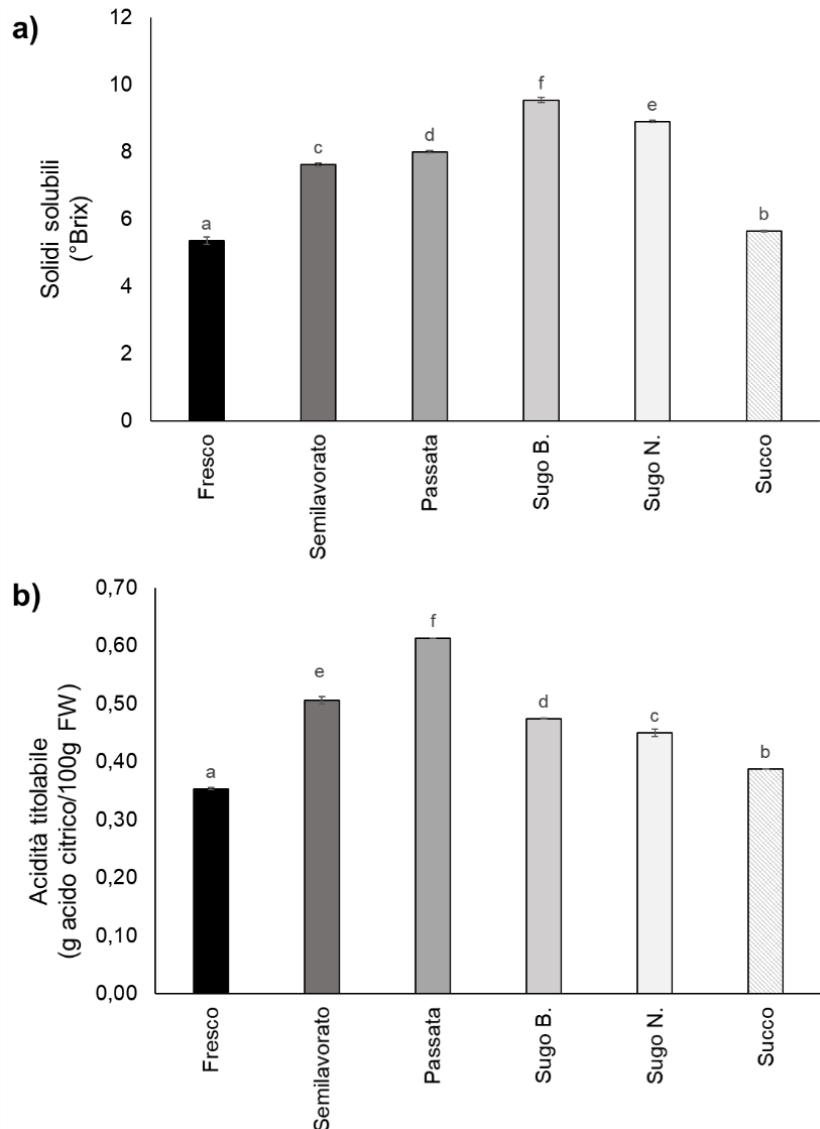
## 4.2 Risultati

I pomodori vengono solitamente consumati freschi o utilizzati per la produzione di prodotti trasformati che possono presentare una composizione diversa rispetto al frutto fresco. Questo studio trova inserimento in un progetto in collaborazione con l'industria BioItalia che prevedeva la caratterizzazione nutrizionale di più sottoprodotti della lavorazione del pomodoro. In particolare, lo studio ha riguardato la varietà di pomodoro Docet da industria tipiche della regione Campania. Le analisi bromatologiche unite alle analisi del contenuto di composti bioattivi e antiossidanti, come fenoli e licopene, hanno permesso di valutare le diverse tecniche di trasformazione, dimostrando come sia possibile arrivare all'individuazione delle condizioni adatte per ottenere un alimento funzionale di qualità. I sottoprodotti analizzati appartenevano tutti allo stesso lotto e nello specifico, sono stati: pomodoro fresco, pomodoro semilavorato, passata di pomodoro, sugo di pomodoro pronto al basilico e alla napoletana, succo di pomodoro da bere.

### 4.2.1 Analisi chimico fisiche

Su questi campioni è stato determinato il contenuto di composti bioattivi e antiossidanti e l'attività antiossidante. In Figura 4.3 è mostrato il contenuto di solidi solubili totali ( $^{\circ}\text{Brix}$ ) e l'acidità titolabile nel prodotto tal quale fresco e nei diversi sottoprodotti presi in esame. I valori di solidi solubili (da 5,36 a 9,54  $^{\circ}\text{Brix}$ ) rispettavano i limiti stabiliti dalla G.U. 232/2005, che richiede valori di  $^{\circ}\text{Brix}$  compresi tra 5 e 12 (Figura 4.3, a). Il livello maggiore di solidi solubili tra i prodotti non arricchiti si ritrova nella passata di pomodoro (+48.25% rispetto al pomodoro fresco). Discorso a parte va fatto per i sottoprodotti con aggiunta di ingredienti, che presentano  $^{\circ}\text{Brix}$  maggiore e acidità comparabile al controllo fresco.

Per l'acidità titolabile sono i prodotti “semilavorato” e “passata” di pomodoro ad aver mostrato un'acidità maggiore, presentando rispettivamente  $0,50 \pm 0,012$  g acido citrico/100 g FW e  $0,61 \pm 0,000$  g acido citrico /100 g FW rispetto ai  $0,35 \pm 0,004$  g acido citrico /100 g FW del controllo non trasformato (Figura 4.3, b).



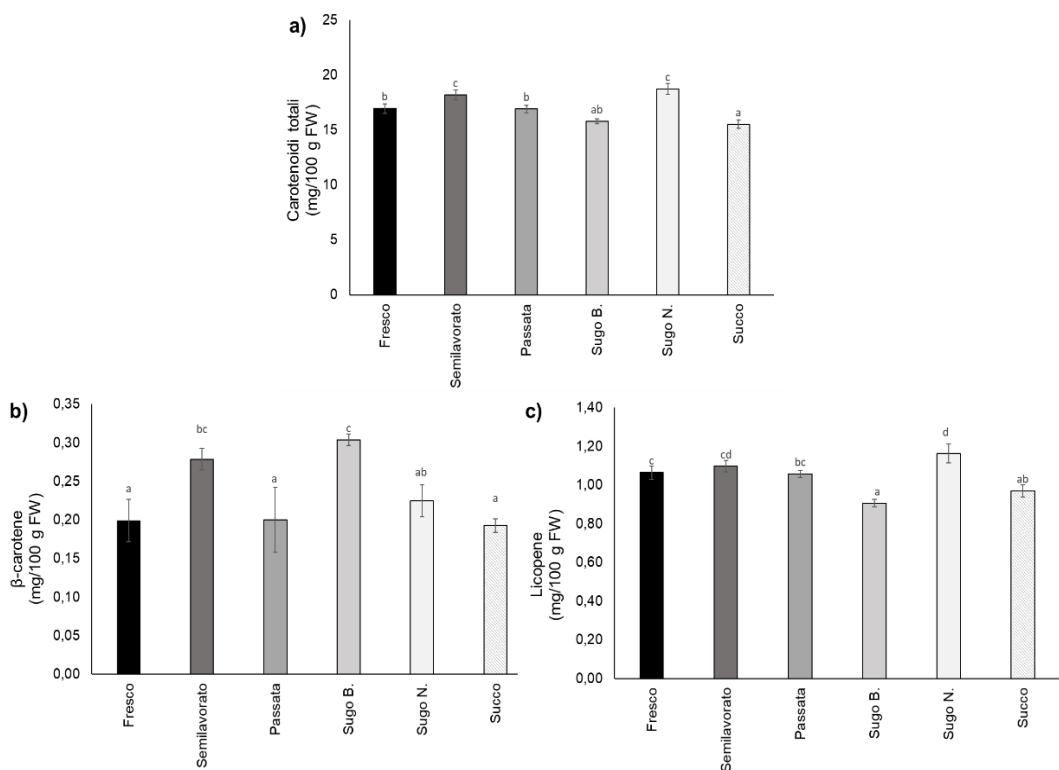
**Figura 4.3.** a) contenuto di solidi solubili (°Brix); b) acidità titolabile in diversi sottoprodotti del pomodoro. I dati sono la media  $\pm$  SE. Le lettere diverse indicano differenze significative in base al test di Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4.2.2 Antiossidanti e composti bioattivi

La concentrazione di antiossidanti e composti bioattivi può cambiare in risposta a diverse condizioni di lavorazione e in particolare, in risposta alle alte temperature, l'acidità, l'ossidazione, la luce, la solubilità. Per questo motivo in questo lavoro di tesi è stato monitorato il contenuto di antiossidanti nei diversi sottoprodotti in esame e nel prodotto fresco.

La Figura 4.4 riporta il contenuto di antiossidanti lipofili nelle matrici testate. Tra le sei matrici testate a presentare variazione rispetto al prodotto fresco sono stati

il prodotto semilavorato, i sughi aggiunti e il succo nel solo parametro carotenoidi totali. Il prodotto tal quale fresco riportava una concentrazione pari a  $19,96 \pm 1,33$  mg/100 g FW. Comparato a questo, i sottoprodotti “semilavorato” e “sugo alla napoletana” riportavano un incremento del 7,25% e del 10,55%, rispettivamente. L’unico sottoprodotto a mostrare una diminuzione notevole di carotenoidi è il succo, con una diminuzione dell’8,38% rispetto al pomodoro fresco.



**Figura 4.4.** a) contenuto di carotenoidi totali, b)  $\beta$ -carotene e c) licopene in diversi sottoprodotti del pomodoro. I dati sono medie  $\pm$  SE. Le lettere diverse indicano differenze significative in base al test di Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Il contenuto di vitamina C (Tabella 4.1) resta invariato solo nel sottoprodotto “passata” rispetto al controllo fresco, diminuendo in misura equivalente (-20%) in tutti gli altri sottoprodotti tranne nel succo dove il decremento risulta essere maggiore e pari al 73,08%.

È possibile notare lo stesso significativo decremento con la trasformazione anche nella concentrazione di fenoli (Tabella 4.1). Unica eccezione era per il sugo al basilico che mostrava una concentrazione di fenoli paragonabile a quella del controllo fresco ( $14,90 \pm 4,07$  mg/100 g FW). Anche per questa classe di composti

bioattivi, il sottoprodotto che riporta la minor concentrazione è il succo che mostrava una concentrazione di fenoli pari a  $8,18\pm2,73$  mg/100 g FW.

Dopo aver valutato il contenuto dei singoli antiossidanti, abbiamo studiato l’azione sinergica delle molecole bioattive nella matrice alimentare attraverso la valutazione dell’attività antiossidante totale lipofila (LAA) e idrofila (HAA) (Tabella 4.1). Come atteso, nei sottoprodotti dei lotti in esame è stata evidenziata una generale diminuzione della frazione antiossidante lipofila e idrofila rispetto al prodotto fresco. Per quanto riguarda l’attività antiossidante idrofila (HAA) sono i due prodotti “sugo alla napoletana” e “sugo al basilico” a presentare il più alto decremento comparati al prodotto fresco ( $19,07\pm0,11$  mg/100 g FW), rispettivamente di 3,35% e 3,61%. Mentre nel sottoprodotto “succo” la concentrazione di antiossidanti idrofili restava invariata.

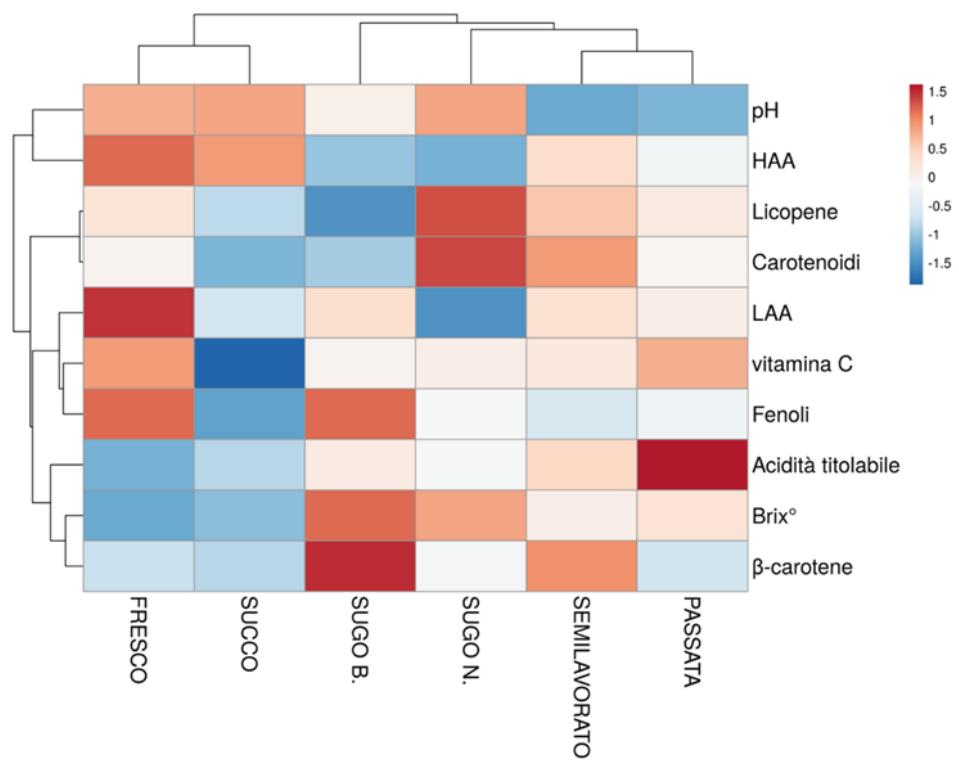
Una generale diminuzione rispetto al prodotto fresco è stata osservata anche per l’attività antiossidante lipofila, ma a subire la maggiore diminuzione sono stati “sugo alla napoletana” e il “succo”, che avevano concentrazioni pari a  $9,79\pm0,01$  mg/100 g FW e  $9,81\pm0,01$  mg/100 g FW.

**Tabella 4.1.** Confronto medio tra vitamina C, fenoli totali, attività antiossidanti totali lipofile e idrofile (LAA e HAA, rispettivamente) in diversi sottoprodotti del pomodoro. Le medie  $\pm$  SD all’interno delle righe e delle colonne seguite da una lettera diversa sono significativamente diverse in base al test di Duncan ( $p \leq 0,05$ ).

Sottoprodotti del pomodoro	Vitamina C (mg/100 g FW)	Fenoli (mg/100 g FW)	HAA ( $\mu$ mol TE/100 g FW)	LAA ( $\mu$ mol TE/100 g FW)
<b>Fresco</b>	$31,95\pm7,44$ c	$14,90\pm4,07$ c	$19,07\pm0,11$ d	$9,86\pm0,01$ d
<b>Semilavorato</b>	$25,85\pm4,332$ b	$10,14\pm0,77$ ab	$18,84\pm0,03$ c	$9,83\pm0,01$ c
<b>Passata</b>	$30,75\pm2,67$ c	$11,03\pm1,36$ b	$18,67\pm0,12$ b	$9,82\pm0,02$ c
<b>Sugo B.</b>	$23,85\pm3,34$ b	$14,94\pm1,43$ c	$18,43\pm0,13$ a	$9,83\pm0,01$ c
<b>Sugo N.</b>	$24,97\pm0,87$ b	$11,31\pm1,48$ b	$18,38\pm0,11$ a	$9,79\pm0,01$ a
<b>Succo</b>	$8,60\pm1,38$ a	$8,18\pm2,73$ a	$18,99\pm0,09$ d	$9,81\pm0,01$ b

La *heat map* in Figura 4.5 mostrava chiaramente che alcuni composti presenti in misura elevata nel prodotto fresco non sono presenti negli altri sottoprodotti nelle medesime concentrazioni. In particolare, il contenuto totale di fenoli, l’attività antiossidante lipofila e idrofila e la vitamina C, sono stati ritrovati in concentrazioni

elevate solamente nei campioni pomodoro fresco non trasformato. Sicuramente è interessante notare come in alcuni sottoprodotti, quali i sottoprodotti con aggiunte (sugo al basilico e sugo alla napoletana), abbiamo dimostrato un aumento della concentrazione della quota di antiossidanti lipofili, come licopene, carotenoidi e  $\beta$ -carotene. Al contrario, il sottoprodotto che presentava una maggiore distanza dal prodotto fresco risultava essere il succo, nel quale risultano invariati solo il pH e la quota di antiossidanti idrofila.



**Figura 4.5.** Analisi *heat map*. La figura è stata generata utilizzando il pacchetto di programmi <http://biit.cs.ut.ee/clustvis> (consultato il 29 ottobre 2022).

## 5 Discussioni

---

I frutti del pomodoro, come quelli di molte altre specie vegetali, sono un'importante fonte di sostanze con noti effetti benefici sulla salute, tra cui vitamine, minerali e antiossidanti (Raiola et al., 2014). Infatti, il consumo di pomodoro è stato associato a una riduzione del rischio di processi infiammatori, del cancro e malattie croniche non trasmissibili (CNCD), tra cui le malattie cardiovascolari (CVD) come la cardiopatia coronarica, l'ipertensione, l'insonnia, il diabete e l'obesità (Raiola et al., 2014).

Per questa ragione, negli ultimi anni, i *breeder* hanno spostato la loro attenzione dall'interesse nel costituire varietà con resa, taglia e forma migliorati (Ballester et al., 2016) a voler agire soprattutto sulle caratteristiche organolettiche e la qualità nutrizionale del pomodoro (Tieman et al., 2017).

L'acido ascorbico (AsA o vitamina C) nel frutto di pomodoro ha una concentrazione relativamente bassa se confrontata con altri frutti (circa 10-40 mg 100 g-1 di peso fresco), anche a causa della selezione artificiale che ha determinato la perdita di circa il 75% della diversità chimica presente nelle specie selvatiche (Rigano et al., 2018; Ruggieri et al., 2016). Sono in corso numerosi progetti per mettere a punto tecnologie innovative per incrementare il contenuto di AsA e di altre molecole antiossidanti nel frutto di pomodoro. Le piante producono AsA attraverso diverse vie biosintetiche, tra le quali la via biosintetica principale del D-mannosio-L-galattosio e le vie biosintetiche secondarie del L-gulosio, del D-galatturonato e del mioinositolo (Badejo et al., 2012; Mellidou et al., 2012; Valpuesta & Botella, 2004). Il cosiddetto *recycling pathway* può inoltre contribuire a regolare l'accumulo di acido ascorbico in pianta (Chen et al., 2003). Infine, poiché l'AsA non è in grado di diffondersi attraverso il doppio strato di fosfolipidi della membrana cellulare, a causa della sua carica negativa a valori di pH fisiologici, è presente una classe di trasportatori che ne permette il trasporto dal citosol in diversi compartimenti cellulari e il trasporto tra sorgente e pozzo (Ruggieri et al., 2015).

Per incrementare il contenuto di antiossidanti nel frutto di pomodoro è necessaria una buona conoscenza dei fattori genetici che sono alla base della regolazione del contenuto di AsA.

Per reintrodurre varianti genetiche inutilizzate da specie selvatiche in varietà coltivate di pomodoro e per facilitare la mappatura di caratteri provenienti da

donatori selvatici, sono state prodotte, circa 20 anni fa, 76 linee di introgressione (IL) e altre sublinee con regioni del genoma di *Solanum pennellii* nel background genetico di *S. lycopersicum* (Eshed & Zamir, 1995; Gur & Zamir, 2015). La combinazione di queste risorse genetiche con quelle genomiche ha consentito l'identificazione di geni candidati per il controllo di alcuni caratteri quantitativi, inclusi quelli che controllano la qualità del frutto e l'accumulo di antiossidanti (Perez-Fons et al., 2014).

Nei laboratori del Dipartimento di Agraria è stata analizzata la linea IL7-3 e alcune sublinee (R176, R178, R181 e R182) che recano QTL (i.e. *Quantitative Trait Loci*) che controllano l'accumulo di AsA e altri antiossidanti nel frutto (Aliberti et al., 2020; Di Matteo et al., 2010; Ruggieri et al., 2015). In particolare, la sublinea R182, che presenta una piccola regione (448 kbp) di genoma selvatico nel background genetico della varietà coltivata M82, mostrava una buona resa e ottime caratteristiche qualitative dei frutti (Aliberti et al., 2020).

Per verificare se la sublinea R182 mantenga le stesse caratteristiche qualitative osservate in piante allevate in serra anche in altri ambienti, in questa tesi sono state analizzate le performance della sublinea R182 e della linea coltivata M82 allevate in pieno campo. È stato interessante notare un incremento dell'altezza e della produttività di R182 rispetto alla linea coltivata. Analisi precedenti (Calafiore et al., 2019) non avevano evidenziato una maggiore produttività di R182 rispetto a M82, ma ciò potrebbe essere dovuto alle diverse condizioni di allevamento utilizzate in questo studio.

L'acidità titolabile, il contenuto di carotenoidi totali, licopene e  $\beta$ -carotene sono tutti parametri importanti per la qualità dei frutti, e il loro aumento è oggi uno dei principali obiettivi della selezione del pomodoro. Questi parametri risultavano tutti più alti nei frutti di R182 rispetto alla linea coltivata. La stessa sublinea, allevata in campo aperto, mostrava, inoltre, valori di acido ascorbico ridotto e totale superiori rispetto a M82 e a quelli solitamente riportati nelle varietà commerciali, confermando il suo potenziale per il miglioramento genetico delle varietà attuali (Ruggieri et al., 2016).

Un altro parametro chiave per la qualità del frutto è il °Brix che è determinato dall'accumulo di zuccheri solubili coinvolti nel metabolismo primario. In accordo

con Calafiore et al. (2019), i frutti della sublinea R182 allevata in pieno campo hanno mostrato un aumento di °Brix rispetto alla linea coltivata. Questi risultati, inoltre, sono in linea con i dati ottenuti da Ikeda et al. (2013) che hanno dimostrato che la linea di introgressione IL7-3, parentale di R182, presenta nel frutto un aumento dei solidi solubili rispetto a M82.

La qualità dei frutti è direttamente correlata al loro profilo metabolico e rappresenta un'indicazione del loro valore commerciale. Acidi organici, zuccheri, vitamina C, insieme a diversi composti antiossidanti, identificano il carattere e la qualità del sapore e delle proprietà organolettiche delle ortive (Petkovsek et al., 2007). Per una caratterizzazione dettagliata di questi caratteri è stata effettuata in questa tesi un'analisi del profilo metabolico della sublinea R182, confrontandola con M82 e con altre sublinee (R176, R178 e R181) provenienti dal medesimo incrocio. Nelle diverse linee non variavano i tempi di maturazione, come dimostrato dai parametri ottenuti con il colorimetro. Tuttavia, la sublinea R182 mostrava un significativo aumento del parametro a\* (rossore) che ha una relazione lineare con la maggior parte dei costituenti del pomodoro, tra cui il licopene (Hyman et al., 2004).

Tra gli antiossidanti lipofili, rispetto al parentale, sono state inoltre dimostrate concentrazioni più alte di  $\beta$ -carotene e di tocoferolo nelle sublinee R182 e R176, che condividono parte della regione introgressa da *S. pennellii* (Calafiore et al., 2016). Le stesse linee mostravano inoltre una concentrazione più alta di acido ascorbico ridotto, confermando quindi i dati ottenuti su piante allevate in pieno campo. Come accennato in precedenza, la via principale per la biosintesi di acido ascorbico in pianta è la via Smirnoff-Wheeler o via del d-mannosio (d-Man)/l-Gal in cui i precursori principali sono glucosio e fruttosio (Smirnoff, 2011; Sodeyama et al., 2021), ma esistono vie alternative tra cui quella del mioinositolo. L'analisi sui diversi metaboliti primari condotta nel nostro studio ha mostrato un più alto contenuto di mioinositolo nelle sublinee R176 e R182 rispetto a M82 e una più alta concentrazione di fruttosio e glucosio solo in R182. Questo dimostra che la più alta concentrazione di AsA osservata in R182 è correlata ad una maggiore concentrazione dei precursori della via Smirnoff-Wheeler e della via del mioinositolo. Questi risultati confermano anche i dati osservati nelle piante allevate

in campo. Una più bassa concentrazione di questi metaboliti si osservava invece nella sublinea R178, che mostrava anche una concentrazione inferiore di acido ascorbico rispetto alle altre sublinee. È interessante notare che la regione introgressa da *S. pennellii* in questa sublinea ha una dimensione maggiore rispetto a quella introgressa nelle sublinee R182 e R176.

Anche gli acidi organici influenzano attivamente la qualità complessiva del frutto di pomodoro che contiene solitamente alte concentrazioni di acido fumarico e succinico (Uluisik, 2021). In questo studio, alte concentrazioni di questi acidi sono state ritrovate nella sublinea R178 rispetto al parentale; valori più bassi sono stati invece riscontrati nella sublinea R182.

Considerando tutti i dati metabolici, le sublinee R176 e R182, risultano essere di particolare interesse per lo sviluppo di alimenti biofortificati. Infatti le due sublinee mostravano contemporaneamente alti livelli di tocoferolo e vitamina C, che agiscono in maniera sinergica nel corpo umano quando ingeriti tramite la dieta. Una dieta ricca di vitamina E, infatti, non può avere un effetto ottimale se non è anche ricca di alimenti che forniscono vitamina C, vitamina B3, selenio e glutathione (Glynn et al., 2007).

Confrontando i dati ottenuti dalle analisi qualitative e metabolomiche con le regioni d'introgressione di tutte le sublinee analizzate, si può quindi ipotizzare che la variabilità dei diversi metaboliti è legata al segmento selvatico introgresso. Le sublinee R182, R176 presentano una porzione introgressa da *S. pennellii* in comune. Pertanto, è plausibile che i geni che aumentano il contenuto di AsA nel frutto di queste linee sono localizzati nella parte a monte della regione d'introgressione, come inizialmente ipotizzato (Aliberti et al., 2020). La regione introgressa da *S. pennellii* in R178, che accumula meno AsA nel frutto, ha invece una dimensione maggiore rispetto a quella introgressa nelle sublinee R182 e R176. Quindi è possibile ipotizzare la presenza di geni che influenzano negativamente l'accumulo di AsA a valle di questo segmento introgresso.

La sublinea R182 oltre ad essere stata oggetto di analisi qualitative approfondite, è stata anche protagonista di analisi genomiche in diversi studi condotti precedentemente nel nostro gruppo di ricerca (Aliberti et al., 2020; Calafiore et al., 2019). Gli strumenti genomici utilizzati per ricostruire la regione introgressa nella

sublinea R182 di *S. pennellii* hanno dimostrato che 39 geni selvatici hanno sostituito 33 geni coltivati. Un gruppo di geni mappati a monte e a valle della regione introgressa sono stati identificati come geni candidati che controllano il contenuto di acido ascorbico nei frutti della sublinea e sono indirettamente o direttamente coinvolti nelle vie degli zuccheri. Tra tutti i geni presenti nella regione di introgressione di R182 (Aliberti et al., 2020) l'attenzione si è concentrata sul gene *Solyc07g049310* (*Major Facilitator Superfamily Protein*; MFSP) e su un gene a valle della stessa regione, *Solyc07g049320* (*Nucleobase Ascorbate Transporter*; NAT). Entrambi i geni potrebbero svolgere un ruolo indiretto nella biosintesi, nell'accumulo di AsA e nel controllo di altri caratteri qualitativi in pomodoro. Il gene *Solyc07g049310/Sopen07g024640* codifica per una proteina della famiglia *Major Facilitator Superfamily* (MFS) a cui appartengono trasportatori di zucchero (Wang et al., 2016). La *Major Facilitator Superfamily* è universale negli organismi viventi e rappresenta il più grande gruppo di trasportatori secondari attivi di membrana, che mediante delle proteine trasportano gli zuccheri attraverso la membrana plasmatica o la membrana vacuolare (Reuscher et al., 2014). Nonostante l'importanza della MFS in termini di numero di proteine e prevalenza diffusa, le informazioni disponibili su questi trasportatori di membrana sono scarse. Studi svolti sul genoma di *Arabidopsis thaliana* hanno affermato che questa superfamiglia di trasportatori sia composta da 218 membri raggruppati in 22 famiglie (Niño-González et al., 2019). Il gene che è stato preso in considerazione in questo lavoro di tesi appartiene alla famiglia dei “*plastidic glucose translocator*” (pGlcT). Questa famiglia è la meno caratterizzata, con il numero più piccolo di membri, ma grazie alla loro localizzazione e funzione questi sono bersagli promettenti nella ricerca di nuove proteine di trasporto che controllano il movimento degli zuccheri tra i compartimenti cellulari nei frutti, ad esempio l'accumulo di glucosio nei vacuoli delle cellule del mesocarpo (Reuscher et al., 2014). Il secondo gene identificato a valle della regione introgressa (*Solyc07g049320*) codifica per una *Nucleobase Ascorbate Transporter* (NAT), coinvolto nel trasporto dell'AsA tra i diversi compartimenti intracellulari (Calafiore et al., 2016). In bibliografia sono disponibili poche informazioni su questo gene nel pomodoro. Cai et al. (2014) hanno eseguito un'analisi sistematica per identificare i

geni NAT nel genoma del pomodoro ed è stato rilevato che sono presenti in totale 12 geni NAT. Il numero di geni NAT è simile a studi precedenti su *Arabidopsis* e riso (Maurino et al., 2006). In aggiunta, un'analisi strutturale ha mostrato che i geni NAT erano dispersi su tutti i cromosomi tranne nel 8 e 9. Inoltre, i cromosomi 4 e 11 presentano due geni NAT ciascuno, mentre solo un gene sul resto dei cromosomi.

Il sistema CRISPR/Cas9, individuato nei batteri come sistema immunitario a carattere adattativo, si è rivelato uno strumento molto utile da impiegare nel campo del *genome editing*. Nel nostro studio, abbiamo scelto di adoperare tale sistema per ottenere mutanti *knock-out* dei suddetti geni candidati nella sublinea R182 e confermare il loro ruolo nell'accumulo in AsA in pomodoro. Essendo questa sublinea ottenuta mediante incrocio con un parentale selvatico (*S. pennellii*), è stata effettuata una preliminare prova di rigenerazione *in vitro* per confermare l'effettiva adattabilità di questo genotipo alla trasformazione genetica. La prova di rigenerazione ha messo in luce le potenzialità della suddetta linea nelle colture *in vitro* riportando risultati simili a quelli mostrati da Tadeu de Faria et al. (2002), che hanno evidenziato maggiori tassi di rigenerazione nelle specie selvatiche di pomodoro rispetto alle cultivar di pomodoro commerciali. La trasformazione mediata da *A. tumefaciens* ha riportato un'efficienza di trasformazione della sublinea R182 del 12.36% per il gene MFSP e 10,6% per il gene NAT. L'efficienza di trasformazione complessiva riportata nel presente studio è significativamente più alta rispetto a quella di studi precedenti, riportati per altre specie, che era del 10-15% (Van Eck et al., 2017).

Quindi sono state generate, usando il sistema CRISPR/Cas9, linee edite di R182 per i due geni candidati. In dettaglio nella generazione T<sub>1</sub> sono state ottenute 53 piante mutate per il gene MFSP e 24 per il gene NAT. La suddetta progenie è stata analizzata per verificare le mutazioni ottenute e l'assenza del gene Cas9, portando alla selezione di 2 mutanti per ciascun gene. Per il gene MFSP i due mutanti selezionati sono stati R182\_A/Tins e R182\_Tins, presentanti entrambi un'inserzione di base, che dovrebbe causare un blocco nella traduzione della proteina corrispondente. Per il gene NAT sono stati selezionati i mutanti

R182\_4/6del e R182\_6del, presentanti entrambe una delezione. In questo caso l'interruzione della traduzione era prevista solo nel mutante biallelico R182\_4/6del.

Una preliminare fenotipizzazione è stata condotta sui genotipi *wild type* M82 e R182 e sui 2 mutanti per ogni gene. Nei mutanti R182\_A/Tins, R182\_Tins e R182\_4/6del, come da ipotesi iniziale, l'*editing* genomico ha portato ad un minor accumulo di acido ascorbico nel frutto. Questi risultati sono in linea con il contenuto di metaboliti primari analizzati nelle stesse linee editate. Per il gene appartenente alla *Major Facilitator Superfamily Protein* (MFSP) i mutanti con un'inserzione di 1 coppia di basi (A/T) hanno riportato una minore concentrazione di saccarosio, glucosio e fruttosio rispetto alla sublinea non trasformata R182. Nelle piante mutate per il gene NAT è stato osservato un comportamento differente a seconda della mutazione. Il mutante riportante una delezione di 6 paia di basi non ha mostrato un diverso profilo metabolico rispetto a R182, mentre la linea editata con una delezione di 4/6 paia di basi ha riportato concentrazioni molto basse di glucosio e fruttosio, principali precursori della biosintesi di acido ascorbico in pianta.

Questi risultati preliminari ci hanno permesso di confermare l'effettivo coinvolgimento dei geni candidati MFSP e NAT nel trasporto e accumulo dell'acido ascorbico in bacca e di identificare un nuovo genotipo, R182, con un'alta efficacia di rigenerazione nelle colture *in vitro*.

I diversi sforzi e progressi, come il *genome editing* e la ricerca di nuova variabilità genetica nelle linee di introgressione, sono volti tutti alla forte esigenza di biofortificazione del pomodoro, che è legata indissolubilmente all'importanza che riveste l'acido ascorbico nell'alimentazione e la sua biodisponibilità nell'uomo. Il pomodoro è infatti uno delle fonti principali di questo antiossidante, considerando anche la sua ampia diffusione e il suo utilizzo nella dieta mediterranea. Nel 2018 la produzione mondiale di pomodoro ha superato i 182 milioni di tonnellate e si stima che più di un quarto della produzione sia stata sottoposta a trasformazione, con un aumento di circa 5,4-9,0 milioni di tonnellate di sottoprodotti (Lu et al., 2019). Alla luce di questi dati, un'attenzione maggiore deve esser posta all'effetto della manipolazione industriale sul contenuto di vitamina C del prodotto fresco (Iswari & Susanti, 2016; Raiola et al., 2014). Questo è uno degli aspetti trattati nel seguente elaborato, trovando inserimento in un progetto in collaborazione con l'industria

BioItalia. Questo studio prevedeva la valutazione degli effetti del processo di trasformazione sul contenuto dei principali composti nutraceutici in cinque sottoprodotti del pomodoro (pomodoro semilavorato, passata di pomodoro, sugo di pomodoro pronto al basilico e alla napoletana e il succo di pomodoro). Una serie di fasi di trasformazione multiple, tra cui il trattamento termico, l'evaporazione, la pasteurizzazione, la sterilizzazione e l'incartamento, sono coinvolte nella lavorazione del pomodoro, per inattivare i microrganismi, ammorbidente i tessuti e ridurre il contenuto di acqua (Lima et al., 2022).

È stato dimostrato che i vari metodi di cottura industriali influiscono sui livelli di vitamina C dei pomodori (Iswari & Susanti, 2016). In accordo con questo studio, i dati relativi alla concentrazione di vitamina C nei prodotti trasformati analizzati in questo lavoro hanno dimostrato una degradazione dell'AsA in tutte le matrici, fatta eccezione per la passata di pomodoro. La matrice con la più alta riduzione di questo composto è stato il succo, il quale subisce sia l'omogeneizzazione che il trattamento termico. Il trattamento termico e/o omogeneizzazione possono alterare la matrice cellulare del pomodoro, determinando la biodisponibilità di diversi nutrienti (van het Hof et al., 2000).

Il livello dei composti fenolici e dell'attività antiossidante di ciascuna matrice analizzata è stato fortemente impattato dai trattamenti termici, la maggior parte di questi ha mostrato una differenza significativa rispetto al prodotto fresco. Questo risultato è in accordo con Iswari & Susanti (2016), in cui il metodo di riscaldamento ha avuto un impatto diretto sull'attività antiossidante del sottoprodotto riscaldato.

A causa della struttura altamente insatura del licopene e degli altri carotenoidi essi sono suscettibili di ossidazione durante le varie fasi di lavorazione degli alimenti (Kobori et al., 2014). Nelle diverse matrici analizzate non è stato riscontrato un effetto termico, in accordo con Koh et al. (2012), che riporta anch'esso una stabilità del licopene durante il trattamento termico iniziale (rottura a caldo; 93 °C per 5 min), durante la preparazione del concentrato di pomodoro. Interessante da notare è il più alto contenuto di licopene ritrovato nel sugo alla napoletana rispetto al prodotto fresco, fattore dipendente dall'aggiunta di ingredienti, quali olio, sale, cipolla, origano e basilico. Come dimostrato da Saini et al. (2020), durante l'aggiunta di olio ai prodotti a base di pomodoro (ad esempio

preparazione di salse), le formazioni dell'isomero Z del licopene sono preferite cinematicamente e termodinamicamente alla loro controparte E, portando ad un maggiore contenuto di licopene totale. Pertanto, alti livelli di isomeri Z del licopene si trovano in tali prodotti trasformati. È noto che le forme E del licopene sono a bassa bioaccessibilità rispetto alle forme Z altamente bioaccessibili e bioattive (Rinaldi de Alvarenga et al., 2017).

Considerando i risultati ottenuti con il seguente lavoro è stato possibile confermare l'effettiva perdita di composti nutraceutici, incluso l'acido ascorbico, causata dai diversi trattamenti termici richiesti dall'industria conserviera. Il pomodoro fresco continua quindi a rappresentare la fonte preferibile di acido ascorbico e altri composti antiossidanti benefici alla salute umana.

## 6 Conclusioni

---

Lo scopo principale della presente tesi era aumentare le conoscenze relative alla biosintesi e all'accumulo di acido ascorbico nei frutti di pomodoro e la sua biodisponibilità nei prodotti a base di pomodoro trasformati dall'industria. L'acido ascorbico, comunemente conosciuto come vitamina C, è uno dei più importanti composti antiossidanti per l'uomo, che non è in grado di sintetizzarlo e deve assumerlo con l'alimentazione. Questa vitamina, come altre molecole antiossidanti (carotenoidi, fenoli), svolge un ruolo protettivo contro varie malattie cardiovascolari, cancro e infiammazioni.

Nel primo capitolo, la caratterizzazione per i caratteri produttivi e qualitativi delle quattro sublinee della linea d'introgressione 7-3 di *S. pennellii* effettuata in diverse condizioni ambientali, ha permesso di selezionare le sublinee R182 e R176 come buone candidate per la biofortificazione del pomodoro.

Queste due sublinee condividono parte della regione introgressa di *S. pennellii* ed entrambe hanno presentato alti livelli di vitamina E e C che agiscono in maniera sinergica nel corpo umano quando ingeriti tramite la dieta. I risultati ottenuti hanno dimostrato che le miglior performance della sublinea R182 non dipendono dall'ambiente di crescita ma dalla regione introgressa proveniente dalla specie selvatica.

Nel secondo capitolo, considerando i dati ottenuti dalla caratterizzazione delle sublinee e quelli dei lavori precedenti svolti nel nostro laboratorio, è stata scelta la sublinea R182 per identificare e confermare la funzione di alcuni geni candidati nell'accumulo dell'acido ascorbico, utilizzando la tecnica CRISPR/Cas9. Tra tutti i geni presenti nella regione di introgressione di R182 l'attenzione si è concentrata sul gene *Solyc07g049310* (*Major Facilitator Superfamily Protein*; MFSP) e su un gene a valle della stessa regione, *Solyc07g049320* (*Nucleobase Ascorbate Transporter*; NAT). Il gene MFSP è coinvolto nell'importazione e nell'esportazione di zuccheri che sono precursori della biosintesi dell'acido ascorbico. Il gene NAT invece potrebbe avere un ruolo nel trasporto di acido ascorbico tra i diversi compartimenti intracellulari. I risultati ottenuti dall'analisi genomiche e metabolomiche ci hanno permesso di affermare l'effettivo

coinvolgimento dei geni candidati MSFP e NAT nel trasporto e accumulo dell'acido ascorbico in bacca.

Nel terzo capitolo, considerando gli aumenti del consumo di prodotti a base di pomodoro trasformati dall'industria sono stati valutati gli effetti del processo di trasformazione sul contenuto dei composti antiossidanti. Dall'analisi di diversi sottoprodotti ottenuti con tecniche di trasformazione diverse, è stato affermato l'effettiva perdita di antiossidanti dovuta ai processi termici.

Complessivamente, nella presente tesi la combinazione delle risorse genetiche e genomiche disponibili per il pomodoro ha permesso di ottenere nuove informazioni sulla funzione di alcuni geni candidati per l'accumulo di acido ascorbico nel frutto e di selezionare genotipi superiori. Inoltre, è stato dimostrato che i trattamenti termici della trasformazione industriale portano a una perdita di composti antiossidanti.

Tutti questi risultati potrebbero essere sfruttati nel prossimo futuro per produrre frutti di pomodoro con un valore nutritivo più elevato e ottimizzare il processo produttivo dei prodotti trasformati a base di pomodoro, riducendo al minimo le perdite dei composti nutraceutici.

## 7 Bibliografia

---

- Abushita, A. A., Daood, H. G., & Biacs, P. A. (2000). Change in Carotenoids and Antioxidant Vitamins in Tomato as a Function of Varietal and Technological Factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2075–2081. <https://doi.org/10.1021/jf990715p>
- Akram, N. A., Shafiq, F., & Ashraf, M. (2017). Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00613>
- Aliberti, A., Olivieri, F., Graci, S., Rigano, M. M., Barone, A., & Ruggieri, V. (2020). Genomic Dissection of a Wild Region in a Superior Solanum pennellii Introgression Sub-Line with High Ascorbic Acid Accumulation in Tomato Fruit. *Genes*, 11(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/genes11080847>
- Almeida, J., Quadrana, L., Asís, R., Setta, N., de Godoy, F., Bermúdez, L., Otaiza, S. N., Corrêa da Silva, J. V., Fernie, A. R., Carrari, F., & Rossi, M. (2011). Genetic dissection of vitamin E biosynthesis in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3781–3798. <https://doi.org/10.1093/jxb/err055>
- Alseekh, S., Ofner, I., Pleban, T., Tripodi, P., Di Dato, F., Cammareri, M., Mohammad, A., Grandillo, S., Fernie, A. R., & Zamir, D. (2013). Resolution by recombination: Breaking up Solanum pennellii introgressions. *Trends in Plant Science*, 18(10), 536–538. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.08.003>
- Alseekh, S., Tohge, T., Wendenberg, R., Scossa, F., Omranian, N., Li, J., Kleessen, S., Giavalisco, P., Pleban, T., Mueller-Roeber, B., Zamir, D., Nikoloski, Z.,

- & Fernie, A. R. (2015). Identification and Mode of Inheritance of Quantitative Trait Loci for Secondary Metabolite Abundance in Tomato. *The Plant Cell*, 27(3), 485–512. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.132266>
- Alseekh, S., Tong, H., Scossa, F., Brotman, Y., Vigroux, F., Tohge, T., Ofner, I., Zamir, D., Nikoloski, Z., & Fernie, A. R. (2017). Canalization of Tomato Fruit Metabolism. *The Plant Cell*, 29(11), 2753–2765. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00367>
- Badejo, A. A., Wada, K., Gao, Y., Maruta, T., Sawa, Y., Shigeoka, S., & Ishikawa, T. (2012). Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 229–239. <https://doi.org/10.1093/jxb/err275>
- Ballester, A.-R., Tikunov, Y., Molthoff, J., Grandillo, S., Viquez-Zamora, M., de Vos, R., de Maagd, R. A., van Heusden, S., & Bovy, A. G. (2016). Identification of Loci Affecting Accumulation of Secondary Metabolites in Tomato Fruit of a *Solanum lycopersicum* × *Solanum chmielewskii* Introgression Line Population. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01428>
- Barja, M. V., Ezquerro, M., Beretta, S., Diretto, G., Florez-Sarasa, I., Feixes, E., Fiore, A., Karlova, R., Fernie, A. R., Beekwilder, J., & Rodríguez-Concepción, M. (2021). Several geranylgeranyl diphosphate synthase isoforms supply metabolic substrates for carotenoid biosynthesis in tomato. *New Phytologist*, 231(1), 255–272. <https://doi.org/10.1111/nph.17283>

- Barone, A., Chiusano, M. L., Ercolano, M. R., Giuliano, G., Grandillo, S., & Frusciante, L. (2008). Structural and Functional Genomics of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2008/820274>
- Barrangou, R. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Current Opinion in Immunology*, 32, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.12.008>
- Bertin, N., & Génard, M. (2018). Tomato quality as influenced by preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.056>
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J. K., & Carroll, D. (2003). Enhancing Gene Targeting with Designed Zinc Finger Nucleases. *Science*, 300(5620), 764–764. <https://doi.org/10.1126/science.1079512>
- Blanca, J., Montero-Pau, J., Sauvage, C., Bauchet, G., Illa, E., Díez, M. J., Francis, D., Causse, M., van der Knaap, E., & Cañizares, J. (2015). Genomic variation in tomato, from wild ancestors to contemporary breeding accessions. *BMC Genomics*, 16(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1444-1>
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the Code of DNA Binding Specificity of TAL-Type III Effectors. *Science*, 326(5959), 1509–1512. <https://doi.org/10.1126/science.1178811>
- Bolger, A., Scossa, F., Bolger, M. E., Lanz, C., Maumus, F., Tohge, T., Quesneville, H., Alseekh, S., Sørensen, I., Lichtenstein, G., Fich, E. A., Conte, M.,

- Keller, H., Schneeberger, K., Schwacke, R., Ofner, I., Vrebalov, J., Xu, Y., Osorio, S., ... Fernie, A. R. (2014). The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*. *Nature Genetics*, 46(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/ng.3046>
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>
- Bradeen, J. M. (2021). On the Value of Wild *Solanum* Species for Improved Crop Disease Resistance: Resistances to Nematodes and Viruses. In D. Carputo, R. Aversano, & M. R. Ercolano (A c. Di), *The Wild Solanums Genomes* (pp. 95–118). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30343-3\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30343-3_5)
- Cai, X., Ye, J., Hu, T., Zhang, Y., Ye, Z., & Li, H. (2014). Genome-wide classification and expression analysis of nucleobase–ascorbate transporter (NAT) gene family in tomato. *Plant Growth Regulation*, 73(1), 19–30. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9864-x>
- Calafiore, R., Aliberti, A., Ruggieri, V., Olivieri, F., Rigano, M. M., & Barone, A. (2019). Phenotypic and Molecular Selection of a Superior *Solanum pennellii* Introgression Sub-Line Suitable for Improving Quality Traits of Cultivated Tomatoes. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00190>
- Calafiore, R., Ruggieri, V., Raiola, A., Rigano, M. M., Sacco, A., Hassan, M. I., Frusciante, L., & Barone, A. (2016). Exploiting Genomics Resources to Identify Candidate Genes Underlying Antioxidants Content in Tomato

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00397>

Canady, M. A., Meglic, V., & Chetelat, R. T. (2005). A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome*, 48(4), 685–697. <https://doi.org/10.1139/g05-032>

Caruso, G., Gomez, L. D., Ferriello, F., Andolfi, A., Borgonuovo, C., Evidente, A., Simister, R., McQueen-Mason, S. J., Carputo, D., Frusciante, L., & Ercolano, M. R. (2016). Exploring tomato *Solanum pennellii* introgression lines for residual biomass and enzymatic digestibility traits. *BMC Genetics*, 17(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0362-9>

Causse, M., Duffe, P., Gomez, M. C., Buret, M., Damidaux, R., Zamir, D., Gur, A., Chevalier, C., Lemaire-Chamley, M., & Rothan, C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1671–1685. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh207>

Chen, W., Gao, Y., Xie, W., Gong, L., Lu, K., Wang, W., Li, Y., Liu, X., Zhang, H., Dong, H., Zhang, W., Zhang, L., Yu, S., Wang, G., Lian, X., & Luo, J. (2014). Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism. *Nature Genetics*, 46(7), Art. 7. <https://doi.org/10.1038/ng.3007>

Chen, Z., Young, T. E., Ling, J., Chang, S.-C., & Gallie, D. R. (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3525–3530. <https://doi.org/10.1073/pnas.0635176100>

- D'Ambrosio, C., Stigliani, A. L., & Giorio, G. (2018). CRISPR/Cas9 editing of carotenoid genes in tomato. *Transgenic Research*, 27(4), 367–378. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0079-9>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014. <https://doi.org/10.1021/jf0115589>
- Di Matteo, A., Ruggieri, V., Sacco, A., Rigano, M. M., Carriero, F., Bolger, A., Fernie, A. R., Frusciante, L., & Barone, A. (2013). Identification of candidate genes for phenolics accumulation in tomato fruit. *Plant Science*, 205–206, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.02.001>
- Di Matteo, A., Sacco, A., Anacleria, M., Pezzotti, M., Delledonne, M., Ferrarini, A., Frusciante, L., & Barone, A. (2010). The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*, 10(1), 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-163>
- EFSA / Science, safe food, sustainability. (2022). European Food Safety Authority. <https://www.efsa.europa.eu/en>
- Ercolano, M. R., Di Matteo, A., Andolfo, G., & Frusciante, L. (2021). The Wild Genetic Resources of Tomato: A Reservoir of Useful Genes for the Future. In D. Carputo, R. Aversano, & M. R. Ercolano (A c. Di), *The Wild Solanums Genomes* (pp. 35–49). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-30343-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-30343-3_3)

Eshed, Y., & Zamir, D. (1994). A genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: A tool for fine mapping of genes. *Euphytica*, 79(3), 175–179.  
<https://doi.org/10.1007/BF00022516>

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 QTL. *Genetics*, 141(3), 1147–1162.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/141.3.1147>

Ezquerro, M., Burbano, E., & Rodriguez-Concepcion, M. (2022). *Overlapping and specialized roles of tomato phytoene synthase isoforms PSY1 and PSY2 in carotenoid and ABA production* (p. 2022.08.11.503628). bioRxiv.  
<https://doi.org/10.1101/2022.08.11.503628>

FAOSTAT. (2022). Food and Agriculture Organization of the United Nations.  
<https://www.fao.org/faostat/en/#home>

Feng, D., Ling, W.-H., & Duan, R.-D. (2010). Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-κB in macrophages. *Inflammation Research*, 59(2), 115–121.  
<https://doi.org/10.1007/s00011-009-0077-8>

Francesca, S., Arena, C., Hay Mele, B., Schettini, C., Ambrosino, P., Barone, A., & Rigano, M. M. (2020). The Use of a Plant-Based Biostimulant Improves Plant Performances and Fruit Quality in Tomato Plants Grown at Elevated Temperatures. *Agronomy*, 10(3), Art. 3.  
<https://doi.org/10.3390/agronomy10030363>

Frary, A., Doganlar, S., Frampton, A., Fulton, T., Uhlig, J., Yates, H., & Tanksley, S. (2003). Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit

- characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome*, 46(2), 235–243. <https://doi.org/10.1139/g02-122>
- Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y.-S., Fernie, A. R., & Zamir, D. (2004). Zooming In on a Quantitative Trait for Tomato Yield Using Interspecific Introgressions. *Science*, 305(5691), 1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1101666>
- Gahler, S., Otto, K., & Böhm, V. (2003). Alterations of Vitamin C, Total Phenolics, and Antioxidant Capacity as Affected by Processing Tomatoes to Different Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7962–7968. <https://doi.org/10.1021/jf034743q>
- Gallie, D. R. (2013). The role of l-ascorbic acid recycling in responding to environmental stress and in promoting plant growth. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 433–443. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers330>
- Glynn, R. J., Ridker, P. M., Goldhaber, S. Z., Zee, R. Y. L., & Buring, J. E. (2007). Effects of Random Allocation to Vitamin E Supplementation on the Occurrence of Venous Thromboembolism. *Circulation*, 116(13), 1497–1503. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.716407>
- Godwin, I., Todd, G., Ford-Lloyd, B., & Newbury, H. J. (1991). The effects of acetosyringone and pH on Agrobacterium-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports*, 9(12), 671–675. <https://doi.org/10.1007/BF00235354>
- Graziani, G., Pernice, R., Lanzuise, S., Vitaglione, P., Anese, M., & Fogliano, V. (2003). Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin olive oil systems. *European Food*

*Research and Technology*, 216(2), 116–121.

<https://doi.org/10.1007/s00217-002-0626-7>

Gur, A., & Zamir, D. (2015). Mendelizing all Components of a Pyramid of Three Yield QTL in Tomato. *Frontiers in Plant Science*, 6.

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.01096>

Gürbüz Çolak, N., Eken, N. T., Ülger, M., Frary, A., & Doğanlar, S. (2020). Mapping of quantitative trait loci for antioxidant molecules in tomato fruit: Carotenoids, vitamins C and E, glutathione and phenolic acids. *Plant Science*, 292, 110393. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110393>

Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. *Environmental Health Perspectives*, 102(suppl 10), 5–12. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102s105>

Hyman, J. R., Gaus, J., & Foolad, M. R. (2004). A Rapid and Accurate Method for Estimating Tomato Lycopene Content by Measuring Chromaticity Values of Fruit Purée. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(5), 717–723. <https://doi.org/10.21273/JASHS.129.5.0717>

Ikeda, H., Hiraga, M., Shirasawa, K., Nishiyama, M., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2013). Analysis of a tomato introgression line, IL8-3, with increased Brix content. *Scientia Horticulturae*, 153, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.006>

Isalan, M. (2012). Zinc-finger nucleases: How to play two good hands. *Nature Methods*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1805>

- Iswari, R. S., & Susanti, R. (2016). Antioxidant Activity from Various Tomato Processing. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i1.4722>
- Jiang, F., & Doudna, J. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johansen, I. E., Liu, Y., Jørgensen, B., Bennett, E. P., Andreasson, E., Nielsen, K. L., Blennow, A., & Petersen, B. L. (2019). High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Scientific Reports*, 9(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>
- Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The Tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and Its Botanical Relatives. In M. Causse, J. Giovannoni, M. Bouzayen, & M. Zouine (A c. Di), *The Tomato Genome* (pp. 7–21). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-662-53389-5_2)
- Kobori, C. N., Wagner, R., Padula, M., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2014). Formation of volatile compounds from lycopene by autoxidation in a model system simulating dehydrated foods. *Food Research International*, 63, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.029>
- Koh, E., Charoenprasert, S., & Mitchell, A. E. (2012). Effects of industrial tomato paste processing on ascorbic acid, flavonoids and carotenoids and their

- stability over one-year storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 23–28. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4580>
- Krause, K., Johnsen, H. R., Pielach, A., Lund, L., Fischer, K., & Rose, J. K. C. (2018). Identification of tomato introgression lines with enhanced susceptibility or resistance to infection by parasitic giant dodder (*Cuscuta reflexa*). *Physiologia Plantarum*, 162(2), 205–218. <https://doi.org/10.1111/ppl.12660>
- Li, H., Deng, Z., Liu, R., Loewen, S., & Tsao, R. (2013). Carotenoid compositions of coloured tomato cultivars and contribution to antioxidant activities and protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in H9c2. *Food Chemistry*, 136(2), 878–888. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.020>
- Li, T., Yang, X., Yu, Y., Si, X., Zhai, X., Zhang, H., Dong, W., Gao, C., & Xu, C. (2018). Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing. *Nature Biotechnology*, 36(12), Art. 12. <https://doi.org/10.1038/nbt.4273>
- Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., & Gao, C. (2014). Targeted Mutagenesis in Zea mays Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.12.001>
- Lima, G. P. P., Gómez, H. A. G., Seabra Junior, S., Maraschin, M., Tecchio, M. A., & Borges, C. V. (2022). Functional and Nutraceutical Compounds of Tomatoes as Affected by Agronomic Practices, Postharvest Management, and Processing Methods: A Mini Review. *Frontiers in Nutrition*, 9, 868492. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.868492>
- Lippman, Z. B., Semel, Y., & Zamir, D. (2007). An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current*

- Opinion in Genetics & Development*, 17(6), 545–552.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2007.07.007>
- Liu, H., Ding, Y., Zhou, Y., Jin, W., Xie, K., & Chen, L.-L. (2017). CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Molecular Plant*, 10(3), 530–532. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>
- Lorenzetti, D. L., Quan, H., Lucyk, K., Cunningham, C., Hennessy, D., Jiang, J., & Beck, C. A. (2018). Strategies for improving physician documentation in the emergency department: A systematic review. *BMC Emergency Medicine*, 18(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s12873-018-0188-z>
- Lu, Z., Wang, J., Gao, R., Ye, F., & Zhao, G. (2019). Sustainable valorisation of tomato pomace: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 172–187. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.020>
- Ma, X., Zhu, Q., Chen, Y., & Liu, Y.-G. (2016). CRISPR/Cas9 Platforms for Genome Editing in Plants: Developments and Applications. *Molecular Plant*, 9(7), 961–974. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.009>
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Toti, E., Cambrodón, I. G., Bysted, A., Granado-Lorencio, F., Olmedilla-Alonso, B., Knuthsen, P., Valoti, M., Böhm, V., Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., & Schlemmer, U. (2009). Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S2), S194–S218.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200800053>

- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total Phenolics and Total Flavonoids in Bulgarian Fruits and Vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255–260.
- Martínez-Valverde, I., Periago, M. J., Provan, G., & Chesson, A. (2002). Phenolic compounds, lycopene and antioxidant activity in commercial varieties of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(3), 323–330. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1035>
- Maurino, V. G., Grube, E., Zielinski, J., Schild, A., Fischer, K., & Flügge, U.-I. (2006). Identification and Expression Analysis of Twelve Members of the Nucleobase–Ascorbate Transporter (NAT) Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 47(10), 1381–1393. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl011>
- Mellidou, I., Keulemans, J., Kanellis, A. K., & Davey, M. W. (2012). Regulation of fruit ascorbic acid concentrations during ripening in high and low vitamin C tomato cultivars. *BMC Plant Biology*, 12(1), 239. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-239>
- Michaelson, M. J., Price, H. J., Ellison, J. R., & Johnston, J. S. (1991). Comparison of Plant Dna Contents Determined by Feulgen Microspectrophotometry and Laser Flow Cytometry. *American Journal of Botany*, 78(2), 183–188. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb15745.x>
- Miller, N. J., & Rice-Evans, C. A. (1997). Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS  $\cdot^+$  Radical Cation Assay. *Free Radical Research*, 26(3), 195–199. <https://doi.org/10.3109/10715769709097799>

- Minutolo, M., Amalfitano, C., Evidente, A., Frusciante, L., & Errico, A. (2013). Polyphenol distribution in plant organs of tomato introgression lines. *Natural Product Research*, 27(9), 787–795. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.704371>
- Mueller, L. A., Solow, T. H., Taylor, N., Skwarecki, B., Buels, R., Binns, J., Lin, C., Wright, M. H., Ahrens, R., Wang, Y., Herbst, E. V., Keyder, E. R., Menda, N., Zamir, D., & Tanksley, S. D. (2005). The SOL Genomics Network. A Comparative Resource for Solanaceae Biology and Beyond. *Plant Physiology*, 138(3), 1310–1317. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060707>
- Niño-González, M., Novo-Uzal, E., Richardson, D. N., Barros, P. M., & Duque, P. (2019). More Transporters, More Substrates: The *Arabidopsis* Major Facilitator Superfamily Revisited. *Molecular Plant*, 12(9), 1182–1202. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.07.003>
- Olmstead, R. G., & Bohs, L. (2007). A SUMMARY OF MOLECULAR SYSTEMATIC RESEARCH IN SOLANACEAE: 1982-2006. *Acta Horticulturae*, 745, 255–268. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.745.11>
- Peralta, I. E., Knapp, S., & Spooner, D. M. (2005). New Species of Wild Tomatoes (Solanum Section Lycopersicon: Solanaceae) from Northern Peru. *Systematic Botany*, 30(2), 424–434. <https://doi.org/10.1600/0363644054223657>
- Peralta, I. E., & Spooner, D. M. (2000). Classification of wild tomatoes: A review. *Kurtziana*, 28(1), 145–154.

- Perez-Fons, L., Wells, T., Corol, D. I., Ward, J. L., Gerrish, C., Beale, M. H., Seymour, G. B., Bramley, P. M., & Fraser, P. D. (2014). A genome-wide metabolomic resource for tomato fruit from *Solanum pennellii*. *Scientific Reports*, 4(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/srep03859>
- Pertuzé, R. A., Ji, Y., & Chetelat, R. T. (2003). Transmission and recombination of homeologous *Solanum sitiens* chromosomes in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(8), 1391–1401. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1384-z>
- Peterson, D. G., Boehm, K. S., & Stack, S. M. (1997). Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), A plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(2), 148–153. <https://doi.org/10.1007/BF02812265>
- Petkovsek, M. M., Stampar, F., & Veberic, R. (2007). Parameters of inner quality of the apple scab resistant and susceptible apple cultivars (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 114(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.05.004>
- Petolino, J. F. (2015). Genome editing in plants via designed zinc finger nucleases. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9663-3>
- Podevin, N., Davies, H. V., Hartung, F., Nogué, F., & Casacuberta, J. M. (2013). Site-directed nucleases: A paradigm shift in predictable, knowledge-based plant breeding. *Trends in Biotechnology*, 31(6), 375–383. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.03.004>

- Polívková, Z., Šmerák, P., Demová, H., & Houška, M. (2010). Antimutagenic Effects of Lycopene and Tomato Purée. *Journal of Medicinal Food*, 13(6), 1443–1450. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0277>
- Quadrana, L., Almeida, J., Asís, R., Duffy, T., Dominguez, P. G., Bermúdez, L., Conti, G., Corrêa da Silva, J. V., Peralta, I. E., Colot, V., Asurmendi, S., Fernie, A. R., Rossi, M., & Carrari, F. (2014). Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nature Communications*, 5, 3027. <https://doi.org/10.1038/ncomms5027>
- Rafi, M. M., Yadav, P. N., & Reyes, M. (2007). Lycopene Inhibits LPS-Induced Proinflammatory Mediator Inducible Nitric Oxide Synthase in Mouse Macrophage Cells. *Journal of Food Science*, 72(1), S069–S074. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00219.x>
- Raikwar, S. P., Raikwar, A. S., Chaurasia, S. S., & Mohan, R. R. (2016). Gene editing for corneal disease management. *World journal of translational medicine*, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.5528/wjtm.v5.i1.1>
- Raiola, A., Rigano, M. M., Calafiore, R., Frusciante, L., & Barone, A. (2014). Enhancing the Health-Promoting Effects of Tomato Fruit for Biofortified Food. *Mediators of Inflammation*, 2014, e139873. <https://doi.org/10.1155/2014/139873>
- Rao, A., & Rao, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

- decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reuscher, S., Akiyama, M., Yasuda, T., Makino, H., Aoki, K., Shibata, D., & Shiratake, K. (2014). The Sugar Transporter Inventory of Tomato: Genome-Wide Identification and Expression Analysis. *Plant and Cell Physiology*, 55(6), 1123–1141. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu052>
- Rigano, M. M., Arena, C., Di Matteo, A., Sellitto, S., Frusciante, L., & Barone, A. (2016). Eco-physiological response to water stress of drought-tolerant and drought-sensitive tomato genotypes. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 150(4), 682–691. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.989286>
- Rigano, M. M., Lionetti, V., Raiola, A., Bellincampi, D., & Barone, A. (2018). Pectic enzymes as potential enhancers of ascorbic acid production through the D -galacturonate pathway in Solanaceae. *Plant Science*, 266, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.10.013>
- Rigano, M. M., Raiola, A., Tenore, G. C., Monti, D. M., Del Giudice, R., Frusciante, L., & Barone, A. (2014). Quantitative Trait Loci Pyramiding Can Improve the Nutritional Potential of Tomato ( *Solanum lycopersicum* ) Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(47), 11519–11527. <https://doi.org/10.1021/jf502573n>
- Rinaldi de Alvarenga, J. F., Tran, C., Hurtado-Barroso, S., Martinez-Huélamo, M., Illan, M., & Lamuela-Raventos, R. M. (2017). Home cooking and ingredient synergism improve lycopene isomer production in Sofrito. *Food Research International*, 99, 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.01.009>

Robert, V. J. M., West, M. A. L., Inai, S., Caines, A., Arntzen, L., Smith, J. K., & St.clair, D. A. (2001). Marker-assisted introgression of blackmold resistance QTL alleles from wild *Lycopersicon cheesmanii* to cultivated tomato (*L. esculentum*) and evaluation of QTL phenotypic effects. *Molecular Breeding*, 8(3), 217–233. Scopus. <https://doi.org/10.1023/A:1013734024200>

Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *The Plant Journal*, 23(1), 131–142. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00774.x>

Rousseaux, M. C., Jones, C. M., Adams, D., Chetelat, R., Bennett, A., & Powell, A. (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(7), 1396–1408. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0071-7>

Ruggieri, V., Bostan, H., Barone, A., Frusciante, L., & Chiusano, M. L. (2016). Integrated bioinformatics to decipher the ascorbic acid metabolic network in tomato. *Plant Molecular Biology*, 91(4), 397–412. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0469-4>

Ruggieri, V., Sacco, A., Calafiore, R., Frusciante, L., & Barone, A. (2015). Dissecting a QTL into Candidate Genes Highlighted the Key Role of Pectinesterases in Regulating the Ascorbic Acid Content in Tomato Fruit. *The Plant Genome*, 8(2), plantgenome2014.08.0038. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.08.0038>

- Sacco, A., Di Matteo, A., Lombardi, N., Trotta, N., Punzo, B., Mari, A., & Barone, A. (2013). Quantitative trait loci pyramiding for fruit quality traits in tomato. *Molecular Breeding*, 31(1), 217–222. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9763-2>
- Saini, R. K., A. Bekhit, A. E.-D., Roohinejad, S., Rengasamy, K. R. R., & Keum, Y.-S. (2020). Chemical Stability of Lycopene in Processed Products: A Review of the Effects of Processing Methods and Modern Preservation Strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(3), 712–726. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b06669>
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2006). Impact of high-pressure and traditional thermal processing of tomato purée on carotenoids, vitamin C and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 171–179. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2321>
- Scolastici, C., Alves de Lima, R. O., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L. A., Ribeiro, D. A., & Salvadori, D. M. F. (2008). Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 510–514. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.002>
- Scolastici, C., de Lima, R. O. A., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L., Ribeiro, D. A., & Salvadori, D. M. F. (2007). Lycopene activity against chemically induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Toxicology in Vitro*, 21(5), 840–845. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.01.020>
- Seybold, C., Fröhlich, K., Bitsch, R., Otto, K., & Böhm, V. (2004). Changes in Contents of Carotenoids and Vitamin E during Tomato Processing. *Journal*

- of Agricultural and Food Chemistry, 52(23), 7005–7010.  
<https://doi.org/10.1021/jf049169c>
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – A review. *Food Chemistry*, 206, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.033>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Smirnoff, N. (2011). Chapter 4 - Vitamin C: The Metabolism and Functions of Ascorbic Acid in Plants. In F. Rébeillé & R. Douce (A c. Di), *Advances in Botanical Research* (Vol. 59, pp. 107–177). Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385853-5.00003-9>
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., & Loewus, F. A. (2001). BIOSYNTHESIS OF ASCORBIC ACID IN PLANTS: A Renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 437–467.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.437>
- Sodeyama, T., Nishikawa, H., Harai, K., Takeshima, D., Sawa, Y., Maruta, T., & Ishikawa, T. (2021). The d-mannose/l-galactose pathway is the dominant ascorbate biosynthetic route in the moss *Physcomitrium patens*. *The Plant Journal*, 107(6), 1724–1738. <https://doi.org/10.1111/tpj.15413>
- Srivastava, A. K., Lu, Y., Zinta, G., Lang, Z., & Zhu, J.-K. (2018). UTR-Dependent Control of Gene Expression in Plants. *Trends in Plant Science*, 23(3), 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.003>

- Stevens, R., Buret, M., Duffé, P., Garchery, C., Baldet, P., Rothan, C., & Causse, M. (2007). Candidate Genes and Quantitative Trait Loci Affecting Fruit Ascorbic Acid Content in Three Tomato Populations. *Plant Physiology*, 143(4), 1943–1953. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091413>
- Stevens, R., Buret, M., Garchery, C., Carretero, Y., & Causse, M. (2006). Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6159–6165. <https://doi.org/10.1021/jf061241e>
- Tadeu de Faria, R., Destro, D., Filho, J. C. B., & Illg, R. D. (2002). Introgression of in vitro regeneration capability of *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. Into recalcitrant tomato cultivars. *Euphytica*, 124(1), 59–63. <https://doi.org/10.1023/A:1015693902836>
- Tieman, D., Zhu, G., Resende, M. F. R., Lin, T., Nguyen, C., Bies, D., Rambla, J. L., Beltran, K. S. O., Taylor, M., Zhang, B., Ikeda, H., Liu, Z., Fisher, J., Zemach, I., Monforte, A., Zamir, D., Granell, A., Kirst, M., Huang, S., & Klee, H. (2017). A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science*, 355(6323), 391–394. <https://doi.org/10.1126/science.aal1556>
- Uluisik, S. (2021). Chemical and structural quality traits during postharvest ripening regulated by chromosome segments from a wild relative of tomato *Solanum pennellii* IL4-2 and IL5-1. *Journal of Food Biochemistry*, 45(8), e13858. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13858>
- Valpuesta, V., & Botella, M. A. (2004). Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: New pathways for an old antioxidant. *Trends in Plant Science*, 9(12), 573–577. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.10.002>

- Van Eck, J., Swartwood, K., Pidgeon, K., & Maxson-Stein, K. (2017). Agrobacterium tumefaciens-Mediated Transformation of *Setaria viridis*. In A. Doust & X. Diao (Eds.), *Genetics and Genomics of Setaria* (pp. 343–356). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45105-3\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45105-3_20)
- van het Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A., & Hautvast, J. G. A. J. (2000). Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *The Journal of Nutrition*, 130(3), 503–506. <https://doi.org/10.1093/jn/130.3.503>
- Vegetables* Bayer. (2022). Vegetables Bayer. <https://www.vegetables.bayer.com>
- Víquez-Zamora, M., Vosman, B., van de Geest, H., Bovy, A., Visser, R. G., Finkers, R., & van Heusden, A. W. (2013). Tomato breeding in the genomics era: Insights from a SNP array. *BMC Genomics*, 14(1), 354. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-354>
- Wang, X.-Y., Yu, H.-Z., Geng, L., Xu, J.-P., Yu, D., Zhang, S.-Z., Ma, Y., & Fei, D.-Q. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of *Bombyx mori* (Lepidoptera) Larval Midgut Response to BmNPV in Susceptible and Near-Isogenic Resistant Strains. *PLOS ONE*, 11(5), e0155341. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155341>
- Wellburn, A. R. (1994). The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

Wheeler, G. L., Jones, M. A., & Smirnoff, N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, 393(6683), Art. 6683. <https://doi.org/10.1038/30728>

Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), Art. 7385. <https://doi.org/10.1038/nature10886>

Wolucka, B. A., Goossens, A., & Inzé, D. (2005). Methyl jasmonate stimulates the de novo biosynthesis of vitamin C in plant cell suspensions. *Journal of Experimental Botany*, 56(419), 2527–2538. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri246>

Wolucka, B. A., & Montagu, M. V. (2003). GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants \*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47483–47490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309135200>

Wu, X., Kriz, A. J., & Sharp, P. A. (2014). Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quantitative Biology*, 2(2), 59–70. <https://doi.org/10.1007/s40484-014-0030-x>

Xing, H.-L., Dong, L., Wang, Z.-P., Zhang, H.-Y., Han, C.-Y., Liu, B., Wang, X.-C., & Chen, Q.-J. (2014). A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*, 14(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0327-y>

Yadav, R., Rathi, M., Pednekar, A., & Rewachandani, Y. (2016). A Detailed Review on Solanaceae Family. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(1), 369–378.

- Yates, H. E., Frary, A., Doganlar, S., Frampton, A., Eannetta, N. T., Uhlig, J., & Tanksley, S. D. (2004). Comparative fine mapping of fruit quality QTLs on chromosome 4 introgressions derived from two wild tomato species. *Euphytica*, 135(3), 283–296. Scopus. <https://doi.org/10.1023/B:EUPH.0000013314.04488.87>
- Ye, L., Wang, C., Hong, L., Sun, N., Chen, D., Chen, S., & Han, F. (2018). Programmable DNA repair with CRISPRa/i enhanced homology-directed repair efficiency with a single Cas9. *Cell Discovery*, 4(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0049-7>
- Zouari, I., Salvioli, A., Chialva, M., Novero, M., Miozzi, L., Tenore, G. C., Bagnaresi, P., & Bonfante, P. (2014). From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism. *BMC Genomics*, 15(1), 221. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-221>

## 8 Materiale supplementare

---

**Tabella S8.1.** Analisi della varianza dei diversi parametri nei genotipi M82 e R182 coltivati in pieno campo.

	Significatività
	G
<b>Altezza (cm)</b>	**
<b>Peso fresco (g)</b>	ns
<b>Resa (kg/pt)</b>	ns
<b>Solidi solubili (°Brix)</b>	***
<b>Acidità titolabile (g/100 g FW)</b>	***
<b>Consistenza della polpa (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	ns
<b>Carotenoidi (mg/100 g FW)</b>	***
<b>β-carotene (mg/100 g FW)</b>	***
<b>Licopene (mg/100 g FW)</b>	***
<b>Acido ascorbico ridotto (mg/100 g FW)</b>	***
<b>Acido ascorbico totale (mg/100 g FW)</b>	***
<b>Fenoli (mg/100 g FW)</b>	**

G = genotipo, \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001

**Tabella S8.2.** Analisi della varianza dei diversi parametri misurati sulle sublinee R176, R178, R181, R182 IL 7-3 e della linea coltivata M82.

	Significatività
	G
<b>Solidi solubili (°Brix)</b>	ns
<b>Consistenza della polpa (Kg/cm<sup>2</sup>)</b>	***
<b>L*</b>	ns
<b>a*</b>	**
<b>b*</b>	ns
<b>a*/b*</b>	ns
<b>(a*)<sup>2</sup>/(b*)<sup>2</sup></b>	ns
<b>((a*)<sup>2</sup>+(b*)<sup>2</sup>)<sup>0.5</sup></b>	ns
<b>Acido ascorbico ridotto (mg/100 g FW)</b>	***
<b>Acido ascorbico totale (mg/100 g FW)</b>	**
<b>Fitoene (μg/g DW)</b>	***
<b>Luteina (μg/g DW)</b>	ns
<b>β-carotene (μg/g DW)</b>	***
<b>Licopene (μg/g DW)</b>	ns
<b>Carotenoidi totali (μg/g DW)</b>	*
<b>Tocoferolo (μg/g DW)</b>	***

G = genotipo, \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001