

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Scuola di Dottorato in Scienze e Risorse Ambientali

Indirizzo: Nutrizione Sostenibile delle piante XXIV ciclo



“Caratterizzazione di un QTL di pomodoro coinvolto nel controllo della tolleranza della pianta ad una ridotta disponibilità idrica e della qualità del frutto”

Anno Accademico 20010/2011

TUTOR

Dott. Antonio Di Matteo

DOTTORANDO

Dott.ssa Maria Vasco

COORDINATORE DEL DOTTORATO

Prof.ssa Maria Rao

Indice

1. Introduzione	Pag. 1
1.1 Il pomodoro	Pag. 2
1.2 Caratteristiche qualitative del pomodoro	Pag. 7
1.2.1 Consistenza del frutto	Pag. 10
1.2.2 Solidi solubili	Pag. 11
1.3 Gli antiossidanti del pomodoro	Pag. 11
1.3.1 Composti fenolici	Pag. 18
1.3.2 Carotenoidi	Pag. 21
1.4 Lo stress idrico in pomodoro	Pag. 22
1.5 Il miglioramento genetico del pomodoro	Pag. 24
1.5.1 Le linee di introgressione	Pag. 25
1.6 La genomica del pomodoro	Pag. 28
1.7 Scopo della tesi	Pag. 30
2. Materiali e Metodi	Pag. 31
2.1 Materiale vegetale	Pag. 32
2.2 Valutazione comparativa della tolleranza ad apporti idrici ridotti	Pag. 32
2.2.1 I esperimento	Pag. 32
2.2.2 II esperimento	Pag. 34
2.3 Misurazioni fenotipiche	Pag. 37
2.3.1 Acido Ascorbico	Pag. 37
2.3.2 Fenoli totali	Pag. 39

2.3.3 Solidi solubili totali	Pag. 39
2.3.4 Carotenoidi e Clorofille	Pag. 39
2.3.5 Glutazione	Pag. 40
2.4 Caratterizzazione morfologica dell'apparato radicale	Pag. 40
2.5 Analisi statistica dei dati fenotipici	Pag. 42
2.6 Analisi trascrittomico	Pag. 42
2.6.1 Estrazione dell'RNA	Pag. 42
2.6.2 Sintesi dell'RNA antisenso	Pag. 44
2.6.3 Disegno del chip	Pag. 46
2.6.4 Ibridazione e analisi dell'immagine	Pag. 46
2.6.5 Estrazione dei dati, normalizzazione e filtrazione	Pag. 48
2.6.6 Analisi statistiche e procedure bioinformatiche	Pag. 49
2.7 Validazione qRT-PCR	Pag. 49
3. Risultati	Pag. 52
3.1 Caratterizzazione fenotipica della IL 9-2-5 e di M82 sottoposti a differenti regimi idrici	Pag. 53
3.1.1 Produzione quantitativa	Pag. 53
3.1.2 Produzione qualitativa	Pag. 55
3.2 Caratterizzazione morfologica delle linee IL 9-2-5 ed M82 allevate a due differenti livelli di restituzione idrica	Pag. 62
3.3 Caratterizzazione morfologica comparativa dell'apparato radicale nelle linee IL9-2-5 ed M82	Pag. 62
3.4 Analisi Microarray	Pag. 71
3.5 Geni validati mediante qRT-PCR	Pag. 79

4. Discussioni e Conclusioni

Pag. 82

5. Bibliografia

Pag. 102

1. Introduzione

1.1 Il pomodoro

Il pomodoro è una specie ortiva appartenente alla famiglia delle *Solanaceae* il cui centro d'origine si trova in Centro/Sud America, nell'area compresa tra il Cile settentrionale, il Perù e l'Ecuador. Tutte le varietà di pomodoro coltivato fanno parte della specie diploide *Solanum lycopersicum* L. (ex *Lycopersicon esculentum* Mill.). L'habitat naturale del genere *Solanum* è molto variabile, si estende dalle aree costiere con clima molto caldo alle aree montane con clima molto freddo, fino ad arrivare ad altitudini superiori ai 3300 metri. Questa diversità nell'habitat senza dubbio ha contribuito a generare la grande variabilità genetica che si riscontra in questo genere.

Le prime specie, che sono state introdotte in Europa dai conquistatori spagnoli, hanno fornito l'intera base genetica delle cultivar europee e americane, risultando quindi molto simili tra loro. E' stato stimato che solo il 5% della variabilità genetica totale, entro il genere *Solanum*, può essere individuata nella specie *S. lycopersicum*, mentre la maggior parte della variabilità genetica cosiddetta "utile" per molte caratteristiche agronomiche si ritrova nelle specie selvatiche (Foolad, 2007). E' per questo che dagli inizi del 1970 le specie selvatiche di pomodoro sono state utilizzate in programmi di breeding per migliorare le cultivar di pomodoro coltivato. Infatti, il pomodoro coltivato è uno dei primi esempi di piante coltivate che ha significativamente beneficiato di introgressioni di germoplasma selvatico esotico, probabilmente molto più di altre specie coltivate, perché molte sono le accessioni selvatiche dotate di variabilità genetica associata a caratteri importanti per il miglioramento quali la qualità del frutto, la tolleranza a stress abiotici, biotici etc.

E' stato stimato che oltre 62.800 accessioni delle specie selvatiche e coltivate di pomodoro (specialmente di *S. lycopersicum* L.) sono mantenute in banche di germoplasma, tra le principali ricordiamo l'*Asian Vegetable Research and Development Center* (AVRDC) in Cina, la *Plant Genetic Resources Unit* a Ginevra (PGRU), Ny USA, e il centro *CM Rick Tomato Genetics Resource Center* (TGRC), all'Università della California, Davis, USA. Il *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) mantiene una ricca collezione di specie selvatiche di pomodoro, mentre il *Plant Genetic Resources Unit* (PGRU) quella di specie coltivate. Importanti collezioni di germoplasma di pomodoro sono anche mantenute in Olanda (IVT), Russia (VIR), Giappone (NIAS), Perù (DHUNA) e Cuba (INIFAT) (Kalloo, 1991). Oltre alle

accessioni coltivate e selvatiche, ci sono 2000 stock di pomodoro monogenico e mutanti che sono stati caratterizzati fenotipicamente e le cui informazioni sono reperibili in rete (<http://tgrc.ucdavis.edu>; <http://www.zamir.sgn.cornell.edu>) (Foolad, 2007).

Solanum lycopersicum L. è la specie coltivata, sebbene anche *S. pimpinellifolium* -con frutti dal diametro di circa 1 cm- viene coltivata per uso alimentare. Il processo di domesticazione di *S. lycopersicum* ha portato alla trasformazione degli stigmi fiorali da esterni ad interni sul cono staminale trasformando la specie da allogama facoltativa ad autogama (Rick, 1974). Il risultato di questa trasformazione è stato che la maggior parte della variabilità è stata generata entro la specie dando origine essenzialmente a linee pure.

Non è noto quando esattamente sia avvenuta la domesticazione del pomodoro, comunque, già nel tempo in cui la Spagna conquistò il Messico (1523) era sicuramente in atto il processo di domesticazione. Un confronto fra le varianti enzimatiche ha rilevato una similarità molto forte fra le vecchie cultivar europee, le cultivar primitive e i pomodori cherry del Messico e dell'America centrale maggiore della similarità trovata fra quelle originarie della regione Andina.

Oggi, il pomodoro coltivato, *Solanum lycopersicum* L., è la seconda ortiva più coltivata al mondo, dopo la patata (*Solanum tuberosum* L.). Nel 2008 si è registrata una produzione mondiale di circa 130 milioni di tonnellate, contro gli oltre 314 milioni di tonnellate della patata (FAOSTAT 2008; <http://faostat.fao.org>).

Dalla tabella 1.1 si evince che la superficie mondiale coltivata a pomodoro è stata di poco superiore ai 5 milioni di ettari e il continente asiatico con oltre il 56% ha la quota maggiore, segue il continente africano con circa il 23% e al terzo posto troviamo l'Europa con i suoi 574 mila ettari.

Tabella 1.1: Produzione mondiale e superficie coltivata a pomodoro nell'anno 2008

Continente	Superficie (Ha)	% superficie	Produzione (ton)	% produzione
Africa	1.180.943	22.59	12.482.054	9.63
America	509.320	9.74	24.853.939	19.17
Asia	2.954.418	56.51	71.498.620	55.15
Europe	574.512	10.99	20.403.445	15.74
Oceania	8.690	0.17	411.825	0.32
Mondo	5.227.883		129.649.883	

Fonte: nostre elaborazioni dati FAOSTAT 2008

La Cina, gli Stati Uniti d'America, la Turchia, l'India e l'Italia sono i maggiori produttori. La Cina copre il 26% della produzione mondiale, il nostro Paese poco più del 4,5% con i suoi circa 6 milioni di tonnellate.

Nel decennio 1998-2008, i cinque Paesi leader nella produzione di pomodoro sono stati sempre gli stessi, anche se hanno adottato una politica differente, tant'è che mentre la Cina ha aumentato la sua produzione di circa il 98% rispetto al 1998, l'America del 26%, la Turchia del 33% e l'India del 66%, l'Italia ha mantenuto gli stessi livelli sia in termini di produzione sia di superficie coltivata. Nonostante ciò, a livello europeo il nostro Paese è il principale produttore di pomodori, infatti, copre oltre il 29% della produzione totale, che è di poco superiore ai 20 milioni e 400 mila tonnellate, confermando la sua posizione di Paese leader del settore. La resa produttiva si attesta intorno alle 51 tonnellate per ettaro che rispetto al 1998 (49 t/ha) ha subito un incremento del 5% (FAOSTAT 2008; <http://faostat.fao.org>).

Il pomodoro può essere consumato fresco (da mensa) o trasformato per la produzione di pelati, concentrati, passate, polpa, succhi o fiocchi disidratati. Secondo i dati ISTAT del 2008 la produzione nazionale di pomodoro da industria è stata pari a poco più di 4 milioni e 800 mila tonnellate, mentre la produzione di pomodoro da mensa si aggira su 1 milione e 100 mila tonnellate, di cui oltre 500 mila provengono dalle coltivazioni in serra. Le regioni italiane leader nel settore per il pomodoro da industria sono la Puglia con il 31%, seguono l'Emilia Romagna (30%) e la Lombardia (con circa il 10%); per quello da mensa la Sicilia assume il primato con oltre il 22% della produzione nazionale, seguita dalla Campania e dall'Umbria entrambe con l'11% della produzione totale (ISTAT 2008; <http://agri.istat.it>).

L'Ismea (www.ismea.it) ha analizzato la spesa per gli ortaggi freschi dal 2000 al 2003 da cui è emerso che solo per i pomodori essa rappresenta il 17% del volume complessivo, seguita dall'insalata con il 14%.

1.2 Caratteristiche qualitative del pomodoro

La qualità del frutto di pomodoro include una qualità fisico-chimica (consistenza del frutto, pH, solidi solubili totali), una qualità organolettica (gusto) ed una qualità nutrizionale.

In 100 grammi di prodotto fresco di pomodoro si registra mediamente il 95% di acqua, il 3% di zuccheri semplici (glucosio e fruttosio), lo 0,2% di grassi, lo 0,9% di

proteine e l'1,2% di fibra (tab. 1.2). Grassi e proteine sono concentrati soprattutto nel seme. Nonostante il pomodoro non sia particolarmente ricco di vitamine e di fitonutrienti, è però l'ortaggio più consumato, almeno nel nostro Paese, per cui l'apporto di tali alimenti nella dieta risulta significativo.

Il frutto di pomodoro, a causa del relativamente alto contenuto in carotenoidi, è un'importante fonte di antiossidanti lipo-solubili nella dieta umana. La presenza del licopene nel plasma è stata correlata alla riduzione del rischio del cancro alla prostata (Giovannucci *et al.*, 1995). Altri carotenoidi presenti nel pomodoro maturo comprendono β -carotene e piccole quantità di fitoene, fitofluene, δ -carotene, ζ -carotene, neosporene e luteina (Khachik *et al.*, 2002). Il pomodoro è anche un'importante fonte di antiossidanti idro-solubili, in particolar modo acido ascorbico (AsA) e fenoli.

I caratteri quantitativi molto spesso coincidono con i caratteri di interesse agronomico come la resa o la risposta a stress biotici e abiotici. Quindi la comprensione dei meccanismi e delle basi molecolari dell'ereditarietà dei caratteri quantitativi rappresenta una delle principali sfide della genetica e della genomica attuali.

Tradizionalmente, il controllo genetico di un carattere quantitativo in una popolazione naturale o sperimentale si assume dovuto ad un elevato numero di geni, chiamati poligeni. Tali caratteri hanno una variabilità continua. Si assume, inoltre, che la segregazione allelica ai singoli poligeni abbia lo stesso piccolo effetto sul valore fenotipico degli individui, e che quest'ultimo sia parimenti influenzato da effetti ambientali. Tale modello, pur adattandosi bene ad osservazioni sperimentali quali la distribuzione continua dei fenotipi, gli effetti della selezione artificiale, etc., non fornisce indicazioni sulla posizione cromosomica e sulla natura molecolare dei geni coinvolti.

Verso la fine degli anni 80, l'avvento dei marcatori molecolari ha consentito per la prima volta di vagliare l'intero genoma alla ricerca dei loci, chiamati QTL (*Quantitative Trait Loci*), preposti al controllo di un carattere quantitativo. Tali analisi hanno spesso evidenziato diversi QTL per esperimento e diversità degli effetti dei singoli QTL. I QTL caratterizzati da un elevato effetto genico sono spesso indicati come QTL ad effetto maggiore.

Tabella 1.2: Pomodoro (*S. lycopersicum* L.). Valori nutrizionali per 100 grammi di prodotto fresco.

Principi	Valori nutritivi	percentuale di RDA
Energia	18 Kcal	1%
Proteine	0,9 g	1,6%
Grassi totali	0,2 g	0,7%
Colesterolo	0 mg	0%
Fibra	1,2 g	3%
Vitamine		
Acido folico	15 mcg	4%
Niacina	0,594 mg	4%
Piridossina	0,080 mg	6%
Tiamina	0,037 mg	3%
Vitamina A	833 IU	28%
Vitamina C	13 mg	21,5%
Vitamina E	0,54 mg	4%
Vitamina K	7,9 mcg	6,5%
Elettroliti		
Sodio	5 mg	0%
Potassio	237 mg	5%
Minerali		
Calcio	10 mg	1%
Ferro	0,3 mg	4%
Magnesio	11 mg	3%
Manganese	0,15 mg	6,5%
Fosforo	24mg	3%
Zinco	0,17 mg	1,5%
Fito-nutrienti		
Carotene-β	449 mcg	--
Carotene-α	101 mcg	--
Luteina-zeaxantina	123 mcg	--
Licopene	2573 mcg	--

Fonte: *USDA National Nutrient database*

La crescente disponibilità degli strumenti della genomica e lo sviluppo di materiali vegetali appropriati hanno aperto la strada per la determinazione delle basi molecolari di QTL ad effetto maggiore. La conoscenza delle basi molecolari di un QTL offre indicazioni sulla biologia di caratteri di funzioni fisiologiche e di sviluppo complessi, permettendo, quindi, di identificare alleli agronomicamente più validi al *locus* di interesse (Salvi & Tuberosa, 2005).

Tra i primi QTL ad essere stati clonati in pomodoro al fine di comprendere le

basi molecolari di caratteri complessi ci sono *FruitWeight2.2 (FW2.2)* (Frary *et al.*, 2000) un QTL per il peso della bacca, e *Brix9-2-5*, un QTL per il contenuto in zuccheri della polpa (Fridman *et al.*, 2004). Per quanto riguarda il QTL *Brix9-2-5*, ad esempio, è stato evidenziato che è il risultato di un singolo SNP nella sequenza codificante del gene per una invertasi, che si traduce in una sostituzione di un aminoacido (acido glutammico) in un altro (asparagina), con conseguente alterazione della specificità di riconoscimento del saccarosio da parte del sito attivo.

1.2.1 Consistenza del frutto

Il mercato del pomodoro consumato crudo ha delle esigenze ben precise. I consumatori richiedono prodotti ben sviluppati, che abbiano raggiunto la maturazione giusta e che possiedano buone caratteristiche organolettiche. Lo sviluppo e la condizione di produzione, oltre a provvedere e garantire tali esigenze devono far sì che le stesse rimangano inalterate durante la manipolazione e il trasporto fino alla destinazione. La consistenza del frutto è una componente critica perché il consumatore percepisce la qualità del frutto del pomodoro tastando la bacca (Causse *et al.*, 2003; Serrano-Megias & Lopez-Nicolas, 2006). Molti tratti sono coinvolti nella consistenza del frutto, principalmente legati ad attività sensoriali come durezza della polpa, farinosità, succosità e fraganza (Harker *et al.*, 1997; Redgwell & Fischer, 2002; Szczesniak, 2002). I principali cambiamenti avvengono durante la maturazione del frutto, principalmente associati con il rammollimento del frutto che influenza considerevolmente la prestazione dopo la raccolta, per esempio durante il trasporto, la conservazione, la shelf life e la resistenza a patogeni (Brummell & Harpster, 2001). La consistenza del frutto, quindi, è una combinazione tra resistenza della buccia e durezza della polpa (Grotte *et al.*, 2001). Diversi lavori sono stati pubblicati sulla consistenza del frutto di pomodoro e in che modo è possibile misurarla (Batu, 1998). Le misurazioni, in genere, vengono eseguite valutando la consistenza del frutto attraverso le proprietà meccaniche del tessuto della bacca. Il metodo di misurazione più diffuso è il test di Magness–Taylor che associa la consistenza alla massima forza da infliggere ad un campione per comprimerlo (Abbott, 2004). Esistono molti tipi di test per misurare la consistenza sia distruttivi che non ed includono la compressione, l'iniezione, la tensione e la vibrazione.

1.2.2 Solidi solubili

Il successo economico del pomodoro è dettato in parte dalla combinazione della produzione totale dei frutti e del contenuto di solidi solubili totali (°Brix). Il frutto maturo con un alto °Brix richiede una riduzione di acqua in modo da produrre un prodotto alimentare con buone caratteristiche di consistenza e sapore. In più, poiché lo zucchero è il principale costituente dei solidi solubili totali, il frutto risulta più dolce e quindi richiede l'aggiunta di quantità minori di zucchero durante la lavorazione. Ecco perché c'è un interesse considerevole nella manipolazione del contenuto di solidi solubili delle varietà di pomodoro (Baxter *et al.*, 2005).

I solidi totali di un pomodoro coltivato rappresentano il 4–7.5% del suo peso fresco, sebbene questa percentuale possa essere più alta in alcune specie selvatiche (Fridman *et al.*, 2000). I solidi totali sono composti da tutti i componenti del frutto eccetto l'acqua e i volatili. Nel pomodoro coltivato, la quantità di solidi solubili (SS) e insolubili (ISS) rappresenta circa il 75% e il 25%, rispettivamente, di solidi totali. Il glucosio e il fruttosio sono i principali componenti dei SS. Il saccarosio è presente ma in quantità molto piccole. I restanti solidi solubili sono composti da acidi organici, lipidi, minerali e pigmenti. I ISS includono le proteine, la cellulosa, le pectine emicellulari, le pectine e i polisaccharidi, che determinano la viscosità del frutto. La qualità del succo di pomodoro è influenzata dalla viscosità del prodotto. Per i pomodori che sono venduti come prodotto crudo, più alto è il contenuto di solidi solubili più il prodotto acquista un valore maggiore.

L'alto contenuto di zucchero aumenta il sapore nel frutto consumato fresco. Per questi motivi, l'aumento di solidi solubili è stato l'obiettivo di numerosi programmi di *breeding* (Foolad, 2007).

1.3 Gli antiossidanti del pomodoro

Dato i livelli di consumo di questo frutto nel mondo ed il suo contenuto in fitonutrienti con attività antiossidante, il pomodoro rappresenta un importante contributo alla nutrizione umana. Gli antiossidanti presentano effetti benefici sulla salute ed il benessere dell'uomo.

Infatti, numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'importanza nella dieta di frutta e verdura, al fine di prevenire l'insorgenza di malattie cardiovascolari ed alcune forme tumorali (Renaud *et al.*, 1998; Temple, 2000). Recentemente

particolare attenzione è stata dedicata ai derivati del pomodoro, poiché secondo alcuni autori (Franceschi *et al.*, 1994; Giovannucci *et al.*, 1995) il consumo di pomodori e dei suoi derivati (salse, pizza, ketchup) è inversamente correlato con il rischio d'insorgenza dei tumori all'apparato digerente ed alla prostata. Inoltre, studi sperimentali riportano che il licopene esplica attività antiossidante (Levy *et al.*, 1995) ed interferisce con la crescita delle cellule tumorali (Di Mascio *et al.*, 1989; Clinton, 1998). I pomodori, infatti, sono importanti fonti di antiossidanti (vitamina C, potassio ed acido folico, oltre che di carotenoidi) che possono rafforzare quest'azione preventiva.

Studi effettuati sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che alcuni componenti della dieta, tra cui la vitamina E, la vitamina C, l'acido retinoico, i carotenoidi come il licopene (potente antiossidante presente nel pomodoro), i polifenoli come l'idrossitirosole (presente nell'olio di oliva) ed il resveratrolo (presente nel vino rosso), la quercitina e ginesteina presenti nella soia e le catechine presenti nel tè mostrano tutti un effetto inibitorio sull'insorgenza di cancro, suggerendo un effetto chemiopreventivo (Thomasset *et al.* 2007). Comunque solo ultimamente questi studi si sono incentrati sull'analisi del singolo metabolita, come i carotenoidi nel pomodoro (Liu *et al.*, 2003), le proteine in mais (*Zea mays*) (Moose *et al.*, 2004), il contenuto di amido nelle patate (*Solanum tuberosum*) e nel riso (*Oryza sativa*) (Fernie & Willmitzer, 2004) e i livelli di tocoferolo in *Arabidopsis* (Gilliland *et al.*, 2006). Oggi, la qualità del frutto, è uno dei principali obiettivi dei programmi di breeding del pomodoro.

Poiché i pomodori rappresentano un importante contributo alla nutrizione umana mondiale, esiste un crescente interesse verso il miglioramento genetico per aumentare i livelli di antiossidanti del pomodoro sia attraverso il breeding tradizionale (Ronen *et al.*, 1999, Zhang & Stommel 2000) sia attraverso l'utilizzo di strategie biotecnologiche (Giuliano *et al.*, 2000; Romer *et al.*, 2000). Le informazioni di base sulla regolazione degli antiossidanti nel frutto di pomodoro offrono in questo modo l'opportunità di determinare dei miglioramenti nelle caratteristiche nutrizionali del pomodoro.

L'acido ascorbico nell'alimentazione umana

L'acido ascorbico (AsA) comunemente noto come vitamina C, è un composto idrosolubile (che opera quindi in ambienti acquosi, soprattutto nei fluidi extracellulari)

con struttura simile al glucosio. Benché sia abbastanza stabile in soluzione acida, la vitamina C è di norma meno stabile rispetto alle altre vitamine e molto sensibile alla luce, al calore e all'aria, fattori che stimolano l'attività degli enzimi ossidativi.

L'AsA è una molecola dotata di un potere antiossidante di primaria importanza nel mondo dei viventi. Questa sua forte azione riducente, sfruttata in molte reazioni di ossidoriduzione, è dovuta alla sua capacità di donare un elettrone convertendosi in acido monodeidroascorbico (MDA). Quest'ultimo, un composto intermedio con vita breve, può donare un secondo elettrone producendo l'acido deidroascorbico (DHA), che può essere ridotto dall'enzima glutatione-dipendente deidroascorbato reduttasi (DHAR), e rigenerare così AsA o può delattonizzare a 2,3-DKG (Foyer *et al.*, 1991; Washko *et al.*, 1992; Deutsch, 1998). Anche MDA, *in vivo*, può essere ridotto ad AsA attraverso l'attività della NAD(P)-dipendente monodeidroascorbato reduttasi (MDHAR) (Foyer & Halliwell, 1976) o mediante trasferimento elettronico.

A differenza delle vitamine liposolubili (A, D, E, K), che si sciolgono nel grasso dei tessuti dando luogo facilmente a problemi di accumulo con la possibile insorgenza di ipervitaminosi, l'AsA, proprio per la sua natura di vitamina idrosolubile, non si accumula perché il suo eccesso viene eliminato quotidianamente dall'organismo. Da qui però la necessità di dover assumere regolarmente l'AsA mediante apporto alimentare mancando nell'uomo, la capacità di sintesi di tale molecola. Tale incapacità è conseguenza di una mutazione nel gene codificante l'enzima che catalizza la reazione terminale della via biosintetica dell'AsA (Sato & Udenfriend, 1978).

Nell'uomo e negli animali, una delle principali funzioni dell'AsA è quella di sintetizzare il collagene, una proteina, ricca di idrossiprolina ed idrossilisina, necessaria alla formazione del tessuto connettivo della pelle, dei denti, dei legamenti, della cartilagine e delle ossa. Oltre alla funzione strutturale, l'AsA contribuisce al metabolismo di alcuni aminoacidi (come fenilalanina e tirosina) necessari per la sintesi di ormoni; trasforma le forme inattive di acido folico in forma attiva di acido folinico, assumendo un ruolo significativo nel metabolismo del calcio e del ferro; protegge dall'ossidazione molte sostanze (tiamina, riboflavina, acido folico, acido pantotenico, vitamina A ed E), stabilizzandole.

La spiccata azione antiossidante e la capacità di proteggere sostanze facilmente ossidabili rendono tale vitamina un utile additivo alimentare (in molte

industrie, infatti, essa viene aggiunta agli alimenti come tale o sotto forma di sale sodico, potassico e calcico). Più nello specifico, l'AsA è direttamente coinvolta nella riduzione del rischio di malattie degenerative (Gey, 1998) ed è generalmente riconosciuto all'AsA la proprietà di potenziare l'attività dei linfociti e del sistema immunitario in generale (Padayatty *et al.*, 2003; Davey *et al.*, 2000).

Alla luce della riduzione del rischio di contrazione di malattie, organismi scientifici internazionali raccomandano la revisione delle soglie segnalate o richieste di assunzione giornaliera di AsA anche alla luce della biodisponibilità di tale composto per l'organismo umano (*Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington DC, NAS 1997*). In tal senso, sarebbe auspicabile un incremento del contenuto in AsA nei prodotti agro-alimentari primari favorendo così il miglioramento del valore della dieta con diretto beneficio della salute delle popolazioni consumatrici.

L'importanza dell'AsA nelle piante

Nelle piante, l'AsA riveste funzioni di primaria importanza sia nella fisiologia degli stress sia nei processi di crescita e sviluppo. Esso infatti è:

- un antiossidante chiave perché capace di detossificare le specie reattive dell'ossigeno (ROS);
- utilizzato come cofattore perché gioca un ruolo significativo nella fotoprotezione, nella risposta a ferite ed all'invasione di organismi parassiti e patogeni, nell'espansione e nella divisione cellulare;
- precursore di ossalato e tartrato.

Il controllo del livello cellulare di ROS è possibile mediante l'azione combinata di una rete interconnessa di antiossidanti, all'interno della quale l'AsA gioca un ruolo fondamentale (fig. 1.1) perché capace di eliminarne direttamente molte specie reattive (ossigeno singoletto, superossido e radicale idrossile), mediante meccanismi multipli (Padh, 1990). Obiettivo di molti studi è stata la conseguenza di uno stress ossidativo sullo stato dell'AsA in pianta.

Spesso, il pool di AsA incrementa il suo stato di ossidazione in seguito ad una maggiore ossidazione e/o ad un'inefficiente rigenerazione. Infatti, siccome la perdita di un elettrone da parte dell'AsA porta alla formazione del radicale MDA, in molte specie vegetali la concentrazione del radicale aumenta in risposta ad un'ampia varietà di stress che generano ROS, stress causati da erbicidi redox-attivi (come il paraquat, cianide), elevata intensità luminosa, carenza idrica e senescenza (Herbert,

1996).

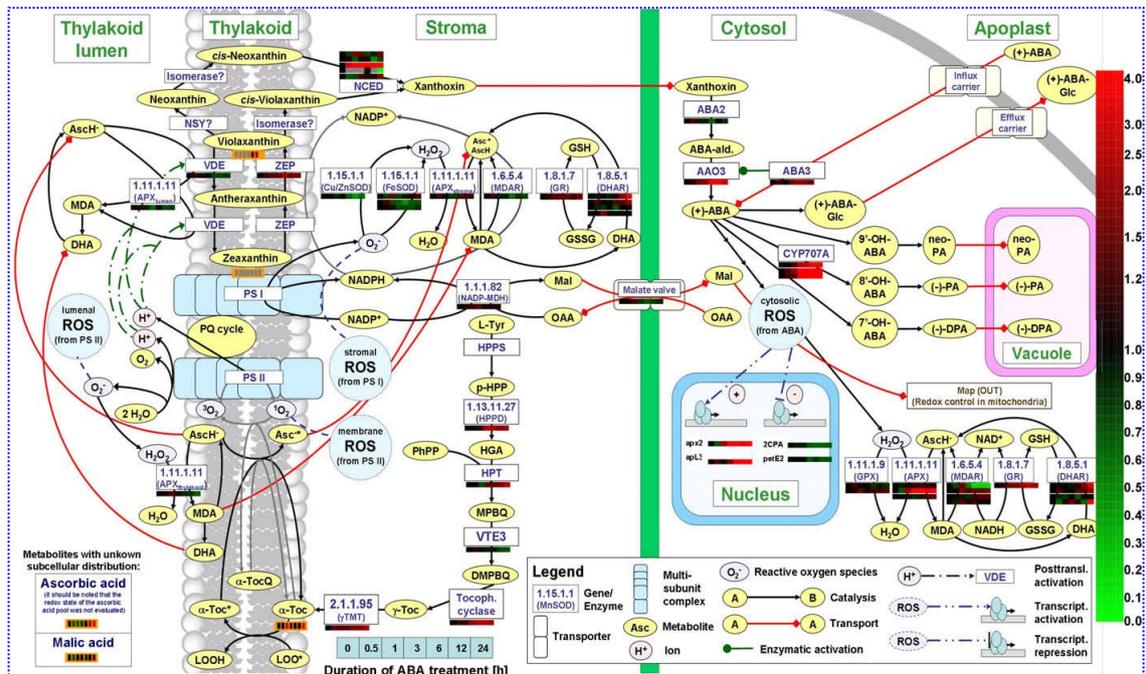


Figura 1.1 Mappa BioPathAt che visualizza la via di controllo della riduzione mediate da ABA (M. Ghassemian *et al.* 2008)

Inoltre, lo stato redox dell'AsA è dipendente, almeno in parte, dalla quantità di ascorbato contenuto nei tessuti.

Le AsA perossidasi (APXs) rappresentano i principali consumatori di AsA nella cellula, generando MDA nella riduzione di H₂O₂ ad H₂O. Differenti isoforme di APX sono localizzati in cloroplasti, perossisomi, citosol e mitocondri (Jimenez *et al.*, 1997). Lo stress salino, inoltre, può aumentare l'attività APX mentre il livello di mRNA rimane costante o addirittura diminuisce (Lopez *et al.*, 1996; Saviouré *et al.*, 1999).

Le vie biosintetiche dell'AsA in pianta

La via biosintetica dell'AsA in pianta è stata identificata solo in tempi relativamente recenti (Wheeler *et al.*, 1998). Tale via è caratterizzata da un'epimerizzazione C5-C6, come suggerito da precedenti studi che rivelano la conservazione dell'idrossile C6 e la perdita di radioattività dal D-[5-3H]-glucosio. Metaboliti intermedi chiave di questa via biosintetica sono D-mannosio-6-fosfato e L-galattosio (fig. 1.2). Infatti, Wheeler *et al.* (1998) hanno osservato che somministrando D-[¹⁴C]-mannosio, a foglie di *Arabidopsis* ed a radici di *Cucurbita pepo*, circa il 10% della radioattività veniva inglobata nell'AsA dopo solo 4 ore di

incubazione. Gli stessi autori dimostrarono, ancora, che fornendo [¹⁴C]-GDP-mannosio e NADPH ad embrioni di pisello era possibile ottenere la sintesi *in vitro* di [¹⁴C]-L-galattosio-1,4-lattone e che, quest'ultimo, poteva essere convertito in [¹⁴C]-AsA se al sistema fossero stati aggiunti mitocondri intatti e, come accettore di elettroni, il citocromo c.

Davey *et al.* (1999) constatarono il ruolo del L-galattosio nella sintesi dell'AsA osservando che tale composto, aggiunto a sospensioni cellulari di *Arabidopsis*, veniva convertito in AsA. L-galattosio, però, può essere sintetizzato anche dal GDP-D-mannosio attraverso l'attività della GDP-D-mannosio-3,5-epimerasi, descritta in studi precedenti (Barber, 1979). Infine una L-galattosio deidrogenasi, parzialmente purificata da pisello ed *Arabidopsis*, ha mostrato la capacità di ossidare L-galattosio a L-galattosio-1,4-lattone, fornendo il substrato per l'enzima L-galattosio-1,4-lattone deidrogenasi (GalLDH) (Wheeler *et al.*, 1998). Ulteriori conferme di questa via biosintetica sono state ottenute studiando il metabolismo dell'acido ossalico. Nella fattispecie, Wagner e Loewus (1973) dimostrarono che l'acido ossalico viene prodotto dall'AsA in seguito alla rottura del legame C2-C3. In piante incubate con [¹⁴C]-L-galattosio è stata osservata una significativa radioattività incorporata nell'acido ossalico (Keats *et al.*, 2000). In questa via biosintetica, l'epimerizzazione del GDP-D-mannosio a GDP-L-galattosio è considerata la reazione limite della sintesi dell'AsA. Tale ipotesi deriva dal fatto che la somministrazione di D-mannosio esogeno non incrementava la dimensione del pool di AsA (Wheeler *et al.*, 1998), mentre la somministrazione di L-galattosio o di L-galattosio-1,4-lattone ne incrementava il tasso di biosintesi approssimativamente da 30 a 70 volte (Davey *et al.*, 1999).

Recenti evidenze sperimentali hanno dimostrato l'esistenza di varie vie biosintetiche alternative di AsA in pianta (Valpuesta & Botella, 2004; fig. 1.2). In una di queste, l'AsA può essere sintetizzato a partire dall'acido D-galatturonico, a sua volta formato dalla degradazione delle pectine. Secondo un'altra via alternativa (simile, nella parte terminale, a quella degli animali), si ritiene che esso sia sintetizzato a partire dal GDP-D-mannosio che, attraverso la formazione di L-gulosio, porta all'acido L-gulonico, poi a L-gulonico-1,4-lattone e, quindi, all'AsA. Un'altra via di sintesi, invece, vede il mio-inositolo come precursore dell'acido L-ascorbico, attraverso la formazione di acido D-glucuronico, acido D-gulonico e L-gulonico-1,4-

lattone. Il ruolo reciproco di queste vie biosintetiche alternative, nel metabolismo dell'AsA nel frutto di pomodoro, non è noto. Tuttavia, alcuni risultati ipotizzano un ruolo del catabolismo delle pectine nella regolazione del livello di AsA anche in questo frutto (Di Matteo *et al.* 2010).

La quantità di AsA nelle cellule vegetali dipende da una fine regolazione della sua sintesi (Smirnoff *et al.* 2001), dal riciclo metabolico e dalla degradazione (Green *et al.* 2005), e, infine, dal suo trasporto (Horemans *et al.* 2000). Il riciclo dell'AsA è particolarmente importante sotto condizioni di stress perché l'AsA ridotto è convertito in un radicale instabile (MDA), che si dissocia in AsA e DHA. Poiché quest'ultimo è instabile e viene rapidamente degradato, il pool di ASA può essere impoverito se le forme ossidate non vengono recuperate da due reductasi: Monodeidroascorbato reductasi (MDHRA) e la deidroascorbato reductasi (DHAR) (Smirnoff *et al.* 2000). Entrambi gli enzimi sono stati studiati in ingegneria genetica, la loro sovra espressione porta ad un aumento dei livelli di AsA (Chen *et al.* 2003) e nel caso della MDHAR, un aumento della tolleranza agli stress (Eltayeb *et al.* 2007).

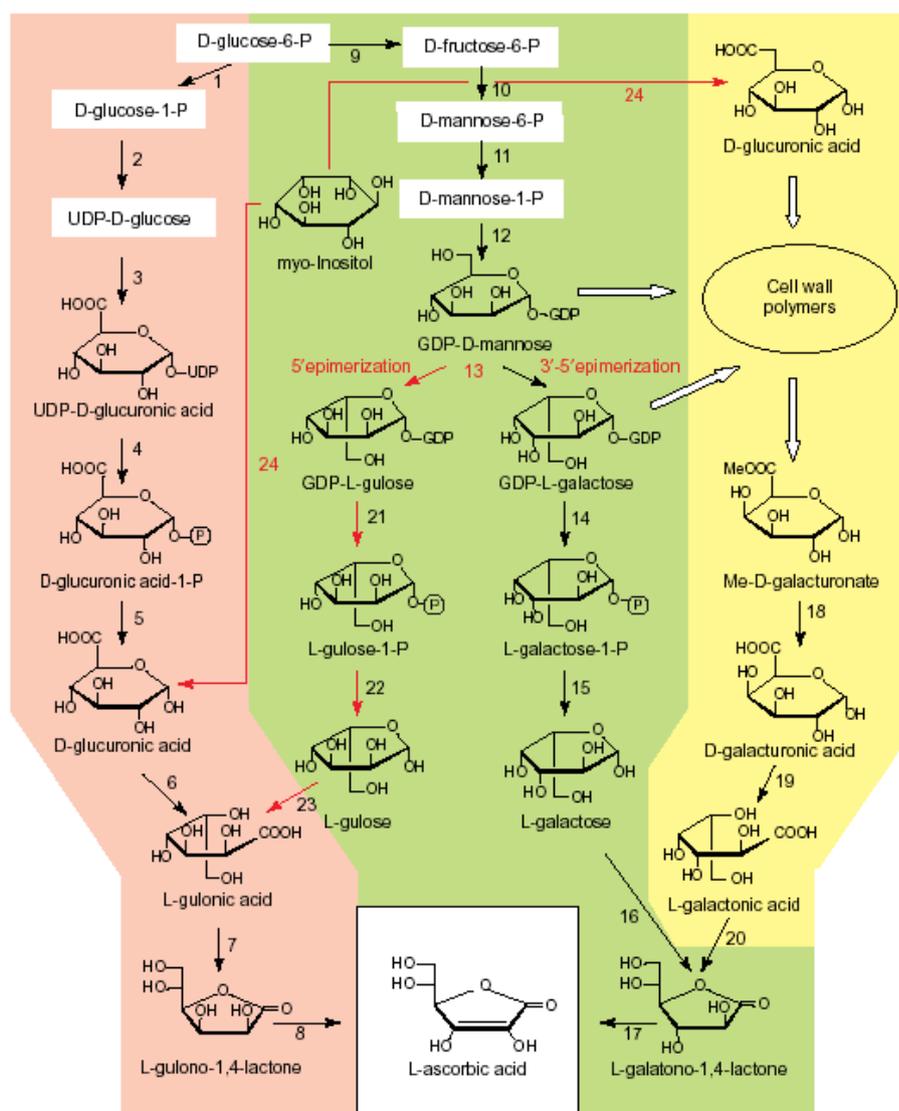


Figura 1.2. Vie biosintetiche alternative dell'AsA in pianta. Via biosintetiche proposte negli animali (reazioni 1–8) e in pianta (reazioni 9–24). Le frecce rosse indicano le attività enzimatiche dei nuovi pathway che portano alla biosintesi di vitamina C. Gli enzimi che catalizzano le reazioni sono: **1**, phosphoglucomutase; **2**, UDP-glucose pyrophosphorylase; **3**, UDP-glucose dehydrogenase; **4**, glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase; **5**, glucurono kinase; **6**, glucuronate reductase; **7**, aldono-lactonase; **8**, gulono-1,4-lactone dehydrogenase; **9**, glucose-6-phosphate isomerase; **10**, mannose-6-phosphate isomerase; **11**, phosphomannomutase; **12**, GDP-mannose pyrophosphorylase (mannose-1-phosphate guanylyltransferase); **13**, GDP-mannose-3',5'-epimerase; **14**, phosphodiesterase; **15**, sugar phosphatase; **16**, L-galactose dehydrogenase; **17**, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase; **18**, methylesterase; **19**, D-galacturonate reductase; **20**, aldono-lactonase; **21**, phosphodiesterase; **22**, sugar phosphatase; **23**, L-gulose dehydrogenase; **24**, myo-Inositol oxygenase.

1.3.1 Composti fenolici

I composti fenolici rappresentano una delle principali classi di metaboliti secondari, la quale comprende un ampio spettro di sostanze molto eterogenee ma tutte caratterizzate dalla presenza di un anello aromatico con uno o più sostituenti

ossidrilici. In alcuni casi la funzione ossidrilica può essere mascherata da una O-metilazione o da altro tipo di sostituzione; inoltre, molti composti accanto agli -OH fenolici contengono altri gruppi funzionali che influenzano le loro proprietà chimico-fisiche. Sebbene un cospicuo numero di sostanze fenoliche sia stato ritrovato in organismi animali, la presenza di una frazione fenolica è una caratteristica peculiare dei tessuti vegetali.

I fenoli sono particolarmente importanti nei prodotti ortofruttili in cui hanno un ruolo preminente nel determinare colore e sapore. In particolare si associa agli acidi fenolici il sapore acidulo, ai tannini l'astringenza, mentre il sapore amaro è spesso associato ad alcuni flavonoidi quali naringenina e neoesperidina; il colore, infine, viene determinato dalla presenza degli antociani e dalle loro caratteristiche reazioni di copigmentazione.

Attualmente sono state identificate diverse migliaia di strutture fenoliche, tra le quali la classe dei flavonoidi è quella numericamente più consistente (sono stati identificati oltre 4000 glicosidi e più di 1.800 agliconi appartenenti a questa classe) (Forkmann & Martens, 2001). Si stima che circa 8000 composti fenolici diversi sono sintetizzati dalle piante, attraverso un'ampia gamma di polimerizzazioni, idrossilazioni, metilazioni, glicosilazioni, acilazioni, prenilazioni e condensazioni (Pourcel *et al.*, 2006). Il largo spettro di molecole rende possibile una varietà di funzioni; ad esempio i flavonoidi forniscono protezione contro le radiazioni UV, gli antociani costituiscono i principali pigmenti dei fiori, l'acido salicilico (SA) è una molecola segnale coinvolta nelle interazioni pianta-microorganismo e i monolignoli sono i costituenti basilari delle lignine che rappresentano il secondo biopolimero più abbondante nel mondo dopo la cellulosa. Le lignine, essendo il maggior componente della parete cellulare, forniscono resistenza meccanica alle piante e impermeabilità ai tessuti vascolari. I prodotti derivanti dal metabolismo dei fenilpropanoidi sono anche importanti per la salute umana in quanto essi funzionano da antiossidanti e possono esercitare una funzione anti-infiammatoria e un'azione chemioprotettiva. Per quanto concerne il ruolo dei fenilpropanoidi nei meccanismi di difesa vegetale, è risaputo che essi vengono accumulati dalla pianta in elevate quantità sviluppando resistenza all'invasione da parte del patogeno (Petersen *et al.*, 1999; Dixon, 2001).

Il contenuto dei composti fenolici nei tessuti vegetali varia in funzione della specie, della varietà, dell'organo considerato, dello stadio fisiologico e delle

condizioni pedoclimatiche. I composti fenolici si accumulano, in genere, in tutti gli organi della pianta (radici, steli, foglie, fiori e frutti), anche se preferenzialmente negli organi aerei. Questa localizzazione preferenziale viene messa in relazione con l'effetto induttore della luce sul metabolismo fenolico, nonché con il ruolo protettivo esercitato dai composti fenolici nei confronti delle radiazioni ultraviolette. In generale, si stabilisce un gradiente decrescente apice-base all'interno di organi dello stesso tipo, mentre, per quanto concerne la localizzazione tissutale, è l'epidermide il tessuto più ricco di composti fenolici. In particolare, considerando gli organi vegetativi, si osserva che essi contengono un tenore più elevato di flavonoidi e di tannini negli strati più esterni rispetto a quelli più interni, mentre il tenore dei derivati dell'acido cinnamico e quello delle cumarine non subisce grandi variazioni passando dall'epidermide superiore al mesofillo. Nel caso dei frutti, i tessuti più esterni sono più ricchi di flavonoidi rispetto agli altri tessuti, mentre acido clorogenico e cumarine sono più uniformemente distribuiti. A livello subcellulare i due principali siti di accumulo dei composti fenolici sono la parete cellulare, dove viene depositata la lignina, ed il vacuolo, dove vengono immagazzinate diverse classi di sostanze fenoliche che presentano una reattività nei confronti dei principali costituenti protoplasmatici. Tale tossicità può essere prevenuta, oltre che da processi di coniugazione, da una rigida compartimentazione cellulare e/o da fenomeni di secrezione.

Sebbene esista un'ampia gamma di fenoli vegetali, la maggior parte di questi sono originati dalla fenilalanina e dalla tirosina. Il primo stadio nella biosintesi dei fenilpropanoidi nelle piante è l'eliminazione di ammoniaca dalla catena laterale per generare il rispettivo acido *trans* (E) cinnamico. Tutte le piante sembrano avere la capacità di deamminare la fenilalanina attraverso l'enzima fenilalanina ammonia liasi (PAL) ma la corrispondente trasformazione della tirosina (TAL) è meno comune essendo limitata alle sole graminacee. In seguito ad una reazione di ossidrilazione dipendente da citocromo P-450 l'acido cinnamico è trasformato in acido 4-cumarico. Altri acidi cinnamici sono poi ottenuti tramite ulteriori reazioni di ossidrilazione e metilazione. Questi fenoli sono derivati da un comune mattone biosintetico, costituito da un anello aromatico con una catena alifatica laterale con tre atomi di carbonio (C6-C3). Tra gli acidi idrossi-cinnamici quelli più frequentemente ritrovati sono gli acidi caffeico, universalmente diffuso nelle piante superiori, p-cumarico, ferulico e sinapico. Normalmente questi composti si ritrovano in forma coniugata, e la loro

presenza in forma libera, in genere, è la conseguenza di un artefatto (idrolisi chimica o enzimatica) verificatosi durante l'estrazione dei tessuti vegetali. Gli acidi idrossicinnamici ed i loro derivati possono esistere sia in forma cis (Z) che in forma trans (E), interconvertibile l'una nell'altra specialmente per effetto della luce UV: la forma prevalente in natura è quella trans, che è la forma più stabile. Anche gli alcoli corrispondenti agli acidi p-cumarico, ferulico e sinapico, sono ampiamente diffusi nelle piante, anche se a concentrazioni molto basse, in quanto costituiscono gli immediati precursori della lignina.

I mattoni biosintetici C6 – C3 sono quindi la base di partenza per altre vie biosintetiche che permettono la produzione di una varietà di fenoli vegetali: flavonoidi (C6 – C3 – C6), proantocianidine ((C6 – C3 – C6)_n), stilbeni (C6 – C2 – C6), coumarine (C6 – C3), lignani (C6 – C3 – C3 – C6), and lignine ((C6 – C3)_n).

In pomodoro il principale composto fenolico è rappresentato dall'acido clorogenico (5'-acido caffeoilchinico), un acido idrossicinnamico esterificato con acido chinico. I flavonoidi rutina (quercetin-3-ramnosilglucoside) e naringenina, rispettivamente nella forma coniugata e non coniugata, ed alcuni flavonoli come la miresticina sono ugualmente rappresentati tra i metaboliti del pomodoro. Più recentemente anche il resveratrolo, il quale è presente fondamentalmente nell'uva, è stato trovato nel pomodoro (Nicoletti *et al.*, 2007).

1.3.2 Carotenoidi

I carotenoidi sono isoprenoidi liofili prodotti da tutti gli organismi fotosintetici e da batteri e funghi non fotosintetici. Negli animali, i carotenoidi provengono dalla catena alimentare e fungono da coloranti e precursori dei metaboliti essenziali, come la retina, il retinolo e l'acido retinoico. Nelle piante i carotenoidi sono localizzati nei complessi di raccolta della luce e nei centri delle reazioni fotosintetiche, dove assorbono la luce e dissipano l'eccesso di energia (Demmig-Adams & Adams, 1992, 2000; Niyogi, 1999). La via biosintetica dei carotenoidi in pianta è localizzata nei plastidi e di recente è stata studiata dal punto di vista molecolare (DellaPenna & Pogson, 2006). Essa diverge dal metabolismo del carbonio C3 per l'azione dell'enzima deoxyxylulose phosphate synthase, seguono, poi, una serie di enzimi della via del nonmevalonato (Hunter, 2007), che cedono l'isopentenil difosfato (IPP; C5), la struttura di tutti gli isoprenoidi. IPP e il suo isomero dimetilallil difosfato

(DMAPP) sono poi convertiti in caroteni attraverso le reazioni di condensazione dell'allungamento della catena catalizzata dalle geranylgeranyl difosfato sintasi (GGPPS) e fitoene sintasi (PSY). La PSY ha il ruolo principale nella biosintesi dei carotenoidi (von Lintig *et al.*, 1997; Welsch *et al.*, 2000). La regolazione della sintesi dei carotenoidi avviene spesso su diverse PSY. Mentre in *Arabidopsis* è presente una sola PSY, in pomodoro ce ne sono due, where PSY1 è una isoforma specifica di frutto e fiore e PSY2 predomina nei tessuti verdi (Bartley & Scolnik, 1993; Fraser *et al.*, 1999; Giorio *et al.*, 2008). Ci sono anche due PSY in cassava (*Manihot esculenta*; J. Arango, unpublished data), due in carote (*Daucus carota*; Just *et al.*, 2007), e tre in riso (Welsch *et al.* 2008).

E' stato evidenziato, inoltre, che la via biosintetica dei carotenoidi non contribuisce solo inviando i carotenoidi nella via fotosintetica ma anche nella via di sintesi dei metaboliti regolatori.

L'accumulo dei carotenoidi avviene in molti tessuti vegetali, germogli verdi, fiori, frutti, semi e radici. I livelli dei carotenoidi e il loro contenuto nei tessuti non verdi variano considerevolmente e sono influenzati da molti fattori, come lo stadio dello sviluppo, l'ambiente, stress o la combinazione di tutti questi fattori.

I geni della pianta per gli enzimi della via biosintetica dei carotenoidi sono localizzati nel nucleo, ed i prodotti proteici vengono importati in organuli (Bartley *et al.*, 1991a). Le sonde molecolari per i geni della biosintesi dei carotenoidi sono ormai sempre più diffuse. Nell'ultimo anno, *PDS* è stato clonato da soia (Bartley *et al.* 1991b), pepe (Huguency *et al.*, 1992), e pomodoro (Bartley & Scolnik, dati non pubblicati, GenBank adesione numero M88683; Pecker *et al.*, 1992), e *PSY* è stato identificato come corrispondente al pTOM5, un cDNA per un gene di pomodoro che induce la maturazione dei frutti (Bartley *et al.*, 1992; Bramley *et al.*, 1992). Precedenti lavori sulla biosintesi dei carotenoidi hanno affrontato il controllo dell'espressione *PDS* e *PSY* pomodoro durante la maturazione dei frutti (Maunder *et al.*, 1987; Pecker *et al.*, 1992).

1.4 Lo stress idrico in pomodoro

La deficienza di acqua è una delle principali cause che riducono la produzione nelle coltivazioni di pomodoro e le principali caratteristiche qualitative del frutto (Boyer, 1982). I cambiamenti climatici globali e la previsione sull'estensione delle

aree che sperimenteranno scarsità idriche in futuro, lancia buone sfide per il futuro. Tra queste, il miglioramento genetico delle piante raccoglie il pieno obiettivo di migliorare la produzione agendo sulla tolleranza alla siccità (Passioura, 2007) delle piante agrarie in generale e del pomodoro in particolare.

In letteratura è riportato che le piante, in genere, non accettano passivamente gli stress ambientali, ma attivamente, percependo i segnali di stress e aumentando l'espressione di geni specifici in modo da proteggersi dai danni (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Durante il processo di risposta della pianta allo stress idrico, numerosi sono i geni che vengono indotti. Questi geni possono essere catalogati in due gruppi principali, distinti sulla base delle loro funzioni. Il primo gruppo comprende i geni che codificano per *proteine strutturali* -gli effettori- che si trovano a valle dei segnali di risposta e includono geni osmoregolatori, proteine antiossidanti, acquaporine e le proteine LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (Bailly *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Il secondo gruppo consiste di geni che codificano *proteine regolatorie*, che sono attivatori precoci di risposta e includono fattori trascrizionali e proteine Kinasi. I fattori di trascrizione collegati agli stress sono principalmente bZIP, WRKY, MYB, e AP2/EREBP che hanno un ruolo importante nella tolleranza alla siccità (Abe *et al.*, 1997; Finkelstein & Lynch, 2000; Marè *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Le kinasi includono la CDPK (*Calmodulin Dependent Protein Kinases*), la MAP Kinasi (*Mitogen-Activated Protein Kinases*); RPK (*Receptor Protein Kinases*) e le proteine kinasi ribosomiali, tutte coinvolte nell'amplificazione dei segnali in risposta a diversi fattori di stress (Mizoguchi *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 2004).

L'espressione dei geni indotti dalla siccità possono essere modulate da sistemi di regolazione ABA-dipendenti o indipendenti (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). E' stato notato anche un *cross-talk* tra le risposte allo stress idrico e altri tipi di stress come quello dovuto dalla luce o da stress biotici (Huang *et al.*, 2008).

I cambiamenti dell'espressione genica sotto lo stress idrico, inoltre, causano una serie di alterazioni fisiologiche e biochimiche. La fotosintesi è significativamente influenzata dallo stress idrico, tanto da limitare le normali funzioni di altre vie metaboliche come ad esempio la fissazione dell'azoto (Chaves *et al.*, 2009). La

respirazione, che provvede all'energie per lo sviluppo delle piante, è accelerata durante lo stress idrico (Haupt-Herting *et al.*, 2001).

Il sistema di protezione della pianta, infine, ossia la formazione di antiossidanti, che protegge le cellule vegetali dai ROS (*Reactive Oxygen Species*) è influenzato dallo stress idrico (Apel & Hirt, 2004).

Il pomodoro è un sistema modello per meglio studiare i meccanismi di risposta della pianta allo stress ed è la pianta economicamente più importante della famiglia delle Solanaceae. Esistono diverse specie selvatiche di pomodoro con differenti sistemi di tolleranza agli stress biotici e abiotici. *S. pennellii* LA716, ad esempio, è una specie selvatica utilizzata spesso negli incroci, in quanto in ambienti aridi, le sue foglie meglio tollerano l'aridità (Rick, 1974).

Nonostante lo stress idrico è stato ampiamente documentato in altri tipi di piante come *Arabidopsis* (Seki *et al.*, 2001, 2002; Bray, 2004; Huang *et al.*, 2008), riso (Rabhani *et al.*, 2003; Hazen *et al.*, 2005), fagiolo (Talamè *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009), mais (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2009), sorgo (Pratt *et al.*, 2005) e patata (Vasquez-Robinet *et al.*, 2008), poche informazioni si hanno sul pomodoro.

1.5 Il miglioramento genetico del pomodoro

Il miglioramento genetico del pomodoro è iniziato molto più di 200 anni fa in Europa, principalmente in Italia; questa coltura, fra tutte le specie vegetali, probabilmente è stata quella oggetto di più ampio interesse da parte dei genetisti che oggi dispongono di oltre 700 caratteri a base genetica sia semplice sia poligenica che possono essere utilizzati per il miglioramento genetico (Foolad, 2007).

Il miglioramento genetico del pomodoro, in passato, puntava principalmente all'ottenimento di varietà altamente produttive, con prodotti di elevata pezzatura e di bell'aspetto per attrarre il consumatore realizzando un prodotto che era privo di sapore e poco nutriente. Pertanto gli obiettivi perseguiti dal breeder miravano di più al soddisfacimento dei bisogni dei rivenditori che non dei consumatori.

A partire dagli anni '50 invece il miglioramento genetico ha puntato ad ottenere cultivar di ottima resa, con elevate caratteristiche qualitative e crescenti standard di salubrità sia per il consumatore sia per l'ambiente (Saccardo & Crinò, 2003). I nuovi obiettivi del miglioramento genetico per la qualità del frutto (Di Vaio *et al.*, 2003) coinvolgono un insieme di caratteristiche che vanno da quelle commerciali ovvero

tutti i parametri che rendono il prodotto facilmente vendibile, forma, colore, uniformità e calibro; quelle organolettiche, e cioè l'insieme di quelle proprietà percepibili dai nostri sensi, sapore, odore, sensazioni visive; quelle nutrizionali, che tengono conto della quantità e della qualità degli elementi nutraceutici presenti nel frutto, come vitamine ed antiossidanti; ed infine a quelle sanitarie per le quali i frutti immessi sul mercato devono essere privi di sostanze tossiche, secondo le normative vigenti.

In particolare, un obiettivo ambizioso del miglioramento genetico consiste nel miglioramento complessivo della qualità agendo contemporaneamente su più caratteri come il contenuto in sostanze di interesse nutrizionale, le caratteristiche fisico-chimiche e quelle organolettiche, nonché la stabilità di questi caratteri che dipende dalla tolleranza agli stress biotici ed abiotici. I moderni strumenti di genomica avanzata offrono spesso la possibilità di raggiungere tale obiettivo controllando la piramidizzazione di alleli, geni e QTL favorevoli in un unico genotipo.

Quindi, tra i diversi caratteri che determinano la qualità del frutto di pomodoro, particolare importanza riveste il contenuto di antiossidanti che è presente nelle sue forme ancestrali e che potrebbe essere sfruttato in programmi di miglioramento genetico finalizzato al trasferimento di queste molecole nel pomodoro coltivato, utilizzando sia metodi tradizionali di breeding (Ronen *et al.*, 1999; Zhang & Stommel, 2000) sia mediante l'uso dell'ingegneria genetica (Giuliano *et al.*, 2000; Romer *et al.*, 2000; Butelli *et al.*, 2008).

Attualmente, le strategie di miglioramento stanno puntando non solo sulle tradizionali aree di miglioramento della produzione e della resistenza alle malattie ma, guidate dalle recenti ricerche mediche, sono indirizzate anche sulle qualità nutrizionali e salutistiche del frutto.

1.5.1 Le linee di introgressione

Il miglioramento genetico del pomodoro trae vantaggi dalla disponibilità di risorse genetiche e genomiche che possono rappresentare validi strumenti genetici per lo studio dei caratteri di interesse. Tra queste le Linee di Introgressione (*Introgression Line* IL) offrono la possibilità di dissezionare la variabilità genetica associata a caratteri complessi come quelli che controllano la qualità nutrizionale del frutto e la tolleranza alla siccità della pianta. Lo sviluppo delle IL è stato reso possibile dall'avvento dei marcatori molecolari. Le IL sono piante in cui singoli

segmenti di cromosoma di una specie selvatica affine sono inseriti in condizione di omozigosi nel contesto genomico della specie coltivata (Eshed & Zamir, 1994). La prima popolazione di linee di introgressione di pomodoro è stata costituita attraverso incroci tra la specie selvatica *S. pennellii* (LA0716) e la cultivar M82 della specie coltivata *S. lycopersicum*. La cultivar M82 è una pianta a sviluppo determinato con taglia media e frutti regolari (fig. 1.3).

La specie *S. pennellii* è una specie a frutto verde (fig. 1.4) comunemente usata come materiale per studi genetici in pomodoro. L'accessione LA0716 è stata raccolta nel deserto Peruviano, è una specie autocompatibile, altamente inbred e può essere facilmente incrociata con *S. lycopersicum* (Rick & Tanksley, 1981).



Figura 1.3: Pianta e frutti di *S. lycopersicum* cv M82

La prima generazione di IL consiste di 50 linee di introgressione ognuna portante una singola introgressione della specie *S.pennellii*. Una seconda generazione ha consentito di espandere la popolazione a 76 linee (le 50 linee originali più 26 sub-linee).

Ognuna di essa contiene una singola introgressione proveniente dall'accessione LA0716 di *S. pennellii* nel background genetico della cv M82 di *S. lycopersicum* (http://solgenomics.net/maps/pennellii_il/index.pl).

Queste linee sono particolarmente utili per il mappaggio di QTL (*Quantitative Trait Loci*) di interesse su specifici cromosomi (Lippman *et al.*, 2007). In particolare, la popolazione di 50 linee di introgressione di *S. pennellii* è stata utilizzata anche in lavori condotti per l'identificazione dei QTL per l'acido ascorbico, fenoli totali e carotenoidi in pomodoro (Rousseaux *et al.*, 2005; Di Matteo *et al.*, 2010).



Figura 1.4: Pianta e frutti di *S. pennellii* LA0716

IL9-2-5

La IL9-2-5 porta sul cromosoma 9 un'introgessione della specie selvatica di 9 cM e produce frutti maturi con alto contenuto di solidi solubili ($^{\circ}$ Brix), in particolare di saccarosio e glucosio (Eshed & Zamir 1995). In questa introgessione sono stati identificati due QTL. Uno di questi, PW-9-2-5, è silente durante la crescita (Fridman *et al.* 2002), mentre il secondo, Brix-9-2-5, codifica per una invertasi dell'apoplasto del frutto (LIN5), con alterate proprietà cinetiche (Fridman *et al.* 2000). LIN5 è un gene che codifica per un'invertasi, espressa esclusivamente in frutti e fiori (Godt & Roitsch 1997; Fridman & Zamir 2003), che scinde il saccarosio in glucosio e fruttosio. Fridman (*et al.* 2004) ha delimitato il QTL a un singolo nucleotide che porta al cambiamento di un singolo amminoacido nella proteina con una migliore efficienza cinetica risultante. Ciò porta ad un aumento dell'attività invertasica dell'apoplasto nei tessuti della columella, per tutta la durata della maturazione del frutto. Il risultato finale consiste nell'assumere con più grande capacità apporti di saccarosio esogeno.

La invertasi nell'apoplasto svolge una duplice funzione: 1) scindendo il saccarosio, mantiene il gradiente favorevole per scaricarlo dal floema, ciò comporta un aumento totale della capacità di apportare zucchero negli organi *sink*; 2) agisce innescando un meccanismo attraverso il quale lo zucchero funge da segnale per integrare le risorse e il metabolismo *sink* (Sturm & Tang, 1999). Si nota, infine, un aumento nell'accumulo di amido in stadi precoci del metabolismo del frutto, dovuto proprio all'aumentata disponibilità di zucchero (Baxter *et al.* 2005).

In conclusione la IL9-2-5 possiede un maggiore contenuto di zuccheri nel

frutto a causa dell'aumentata capacità di scaricare lo zucchero dal floema, quindi, provvede un utile strumento per indagare il meccanismo attraverso cui i cambiamenti genetici portano ad un aumento di solidi solubili.

1.6 La genomica del pomodoro

Le nuove risorse genomiche e le tecnologie di ultima generazione per il sequenziamento e l'analisi del genoma e della sua espressione stanno contribuendo sotto molti aspetti alla dissezione molecolare dei caratteri quantitativi. Il genoma di pomodoro è stato sequenziato e una prima versione è stata resa pubblica nel 2010 dal Consorzio Internazionale coinvolto nel *International Solanaceae Genome Project* (SOL) (<http://www.sgn.cornell.edu/solanaceae-project>). Contemporaneamente, sono state rese disponibili nuove tecnologie per lo studio del trascrittoma. Tra queste, differenti *array* sono attualmente disponibili per le analisi di trascrittomica del pomodoro (Alba *et al.*, 2004; Alba *et al.*, 2005), tra cui il *TomatArray1.0* basato sulla tecnologia *Combimatrix*, disegnato sui *Tentative Consensus* del TIGR *Lycopersicon esculentum Gene Index* (Release 11.0, 21 Giugno 2006).

Tra le nuove potenzialità offerte dagli studi di genomica in pomodoro, una delle strategie più potenti per l'identificazione dei meccanismi di regolazione genetica in fenotipi di interesse è la "trascrittomica comparativa", che permette di identificare i profili di espressione di un gran numero di geni su linee e/o trattamenti a confronto. Utilizzando la tecnologia *Microarray*, ad esempio, sono state evidenziate le dinamiche trascrizionali di nove stadi diversi di maturazione nel frutto di pomodoro, basate su un'elevata co-regolazione dei trascritti associati alla traduzione, alla trasduzione del segnale, al metabolismo primario, alla fotosintesi e alla risposta ormonale (Alba *et al.*, 2005). Un altro esempio di approccio trascrittomico sulla dissezione di caratteri complessi in pomodoro è riferito al mutante *hp* (high-pigment), un mutante che produce maggiori livelli di licopene nonché di altri metaboliti salutistici come flavonoidi e vitamine (Bino *et al.*, 2005). L'analisi dell'espressione genica ha permesso così l'identificazione dei geni coinvolti nella regolazione dei carotenoidi. Inoltre, recentemente è stato condotto un esperimento di trascrittomica comparativa per identificare i meccanismi di regolazione trascrizionale dell'acido ascorbico nel frutto di pomodoro, utilizzando una linea di introgressione di *S. pennellii* nel background genetico del pomodoro coltivato *S. lycopersicum* cv. M82 (Di Matteo

et al., 2010). L'analisi *Microarray* ha messo in luce il ruolo chiave del *pathway* dell'acido galatturonico nel regolare il contenuto di AsA nel frutto della IL12-4, che reca una regione del cromosoma 12 proveniente dal genoma di *S. pennellii*.

1.7 Scopo della tesi

Scopo generale della tesi è comprendere i meccanismi genetici di regolazione di alcuni caratteri della qualità del frutto di pomodoro, in risposta ad un ridotto apporto idrico. In particolare, obiettivi specifici del presente lavoro di tesi sono:

1. identificare regioni genomiche che controllano la qualità del frutto di pomodoro in risposta ad un ridotto apporto idrico in genotipi a differente tolleranza;
2. identificare caratteri morfo-fisiologici associati alla differente tolleranza a ridotti apporti idrici;
3. identificare geni candidati coinvolti nel controllo della qualità del frutto in risposta a stati di deficienza idrica.

2. Materiali e Metodi

2.1. Materiale vegetale

I semi della varietà M82 di *S. lycopersicum* (Accessione LA3475) e della IL9-2-5 sono stati forniti dal *Tomato Genetics Resource Center* (TGRC) (<http://tgrc.ucdavis.edu/>). La IL9-2-5 in omozigosi alla regione genomica introgressa dalla specie selvatica *S. pennellii* (LA0716) di pomodoro nel background genomico dalla varietà M82.

Tali materiali sono stati scelti perché coerenti con l'obiettivo di identificare QTL per la tolleranza a ridotti apporti di acqua. In particolare, tra le linee di introgressione è stata scelta la IL9-2-5 che, in prove di campo precedenti, mostrava una produttività interessante in sistemi di coltivazione in asciutto, lasciando, quindi, presupporre una maggiore attitudine a mantenere elevati livelli di produttività in condizioni di ridotta disponibilità idrica.

2.2. Valutazione comparativa della tolleranza ad apporti idrici ridotti

2.2.1. I esperimento

Il I esperimento è stato condotto presso l'Università di Bari (nel 2009) in collaborazione con il prof. L. Ricciardi. Le piante sono state allevate in grandi mastelli dal diametro di 1 m implementati con dispositivi elettronici per il rilevamento automatico dell'umidità del suolo. L'esperimento è stato condotto sotto una copertura orizzontale di policarbonato. In ogni mastello è stata restituita integralmente l'acqua perduta per evapotraspirazione fino al momento dell'allegagione. Quando il 50% delle piante ha mostrato allegagione nelle infiorescenze dei primi palchi delle piante, l'irrigazione è stata diversificata in due trattamenti corrispondenti a due livelli differenti di apporto di acqua. In particolare, i trattamenti si sono concretizzati nella restituzione di un volume di acqua pari a quella perduta per evapotraspirazione (100%) e di un volume di acqua pari al 50% di quella perduta (50%) (fig. 2.1-2.2). I frutti sono stati raccolti allo stadio di rosso maturo e sono state collezionate almeno tre repliche per ogni genotipo. I frutti sono stati usati per saggiare la consistenza e il contenuto di solidi solubili. I frutti sono stati tagliati longitudinalmente, i semi, la columella, la placenta ed i tessutioculari sono stati eliminati, mentre la polpa e l'epidermide risultanti sono stati congelati in azoto liquido. I tessuti congelati sono stati quindi macinati, ridotti in polvere sottile e conservati a -80 °C

fino al successivo utilizzo per le estrazioni di RNA e le misurazioni di acido ascorbico (AsA) e fenoli.

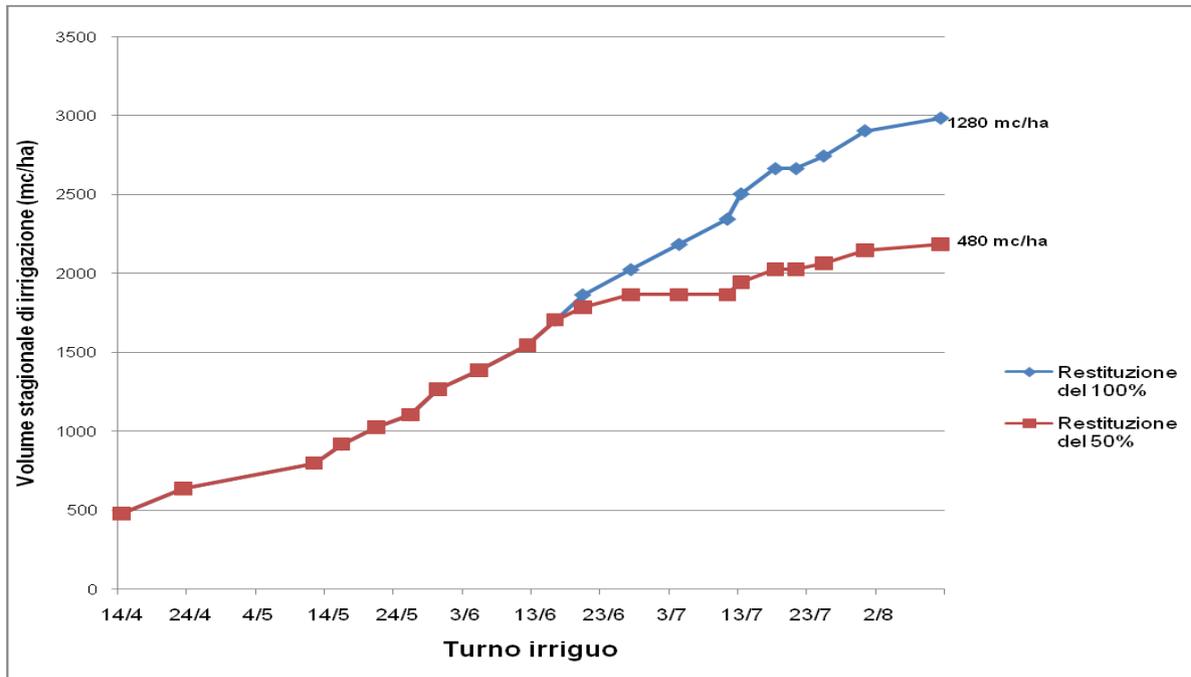


Figura 2.1. Consumi cumulativi di acqua per ciascun trattamento espressi in $\text{mc}\cdot\text{Ha}^{-1}$ di terreno (Anno 2009).



Figura 2.2. Particolare dell'allevamento delle piante in condizioni semi-controllate a Bari nel 2009.

2.2.2. Il esperimento

Il secondo esperimento è stato condotto presso il dipartimento di afferenza in collaborazione con il prof. M. Fagnano e il Dott. N. Fiorentino. Venti semi per ciascun genotipo sono stati fatti germinare su dischetti di carta bibula in piastre Petri e incubati a 25°C al buio fino all'emissione della radichetta. I semi in germinazione sono stati, quindi, trasferiti in contenitori alveolati ed allevati in camera di crescita per circa 30 gg. Quindi 12 piante per IL 9-2-5 e per M82 sono state trapiantate in mastelli dal diametro di ca 100 cm contenente 191,13 L di terreno fertilizzato con 300g di Nitrophoska Blu Gold (N, P, K) sotto un tunnel con copertura in PVC. I trattamenti idrici sono stati randomizzati tra i mastelli secondo un disegno completamente randomizzato (fig. 2.3). Sono state allevate tre piante per ciascun mastello utilizzando 3 piante replica di ciascun genotipo entro ciascun trattamento idrico. L'irrigazione è stata eseguita con volumi tali da portare il tenore idrico del terreno alla capacità di campo fino all'inizio della fase di allegazione. I due trattamenti idrici, corrispondenti alla restituzione del volume d'acqua equivalente all'acqua perduta del mastello per evapotraspirazione (100%) e alla restituzione della metà del volume d'acqua perduta (50%), sono stati diversificati quando il 50% delle piante ha manifestato allegazione sui primi palchi (fig. 2.4). Il terreno utilizzato presenta le caratteristiche riportate nelle tabelle 2.1-2.2.

La capacità di campo (CC) è stata stimata utilizzando l'equazione:

$$CC = 0.3486 - 0.0018 * \% \text{ sabbia} + 0.0039 * \% \text{ argilla} + 0.0228 * \% \text{ sostanza organica} / 0.67 - 0.0738 * \text{densità apparente}$$

mentre la perdita di acqua del vaso è stata derivata secondo la formula:

$$\{CC - [(PF - PS) / PS]\} * (Vol + d) + p$$

“CC” indica la Capacità di Campo, “PF” il peso fresco del terreno prelevato 24 ore prima di ogni irrigazione, “PS” il peso secco del terreno dopo 24 ore in stufa a 105°C, “Vol” è il volume del terreno presente nel mastello, “d” è la densità del terreno calcolata e “p” è la stima della perdita di acqua in 24 ore.

I due trattamenti hanno previsto la restituzione di quote differenti del volume di acqua perduta rispetto alla CC che era stato stimato come appena riportato. In particolare i trattamenti sono stati rappresentati della restituzione di un volume di acqua pari all'acqua perduta (100%) e alla metà dell'acqua perduta (50%) (tab. 2.3; fig. 2.5).

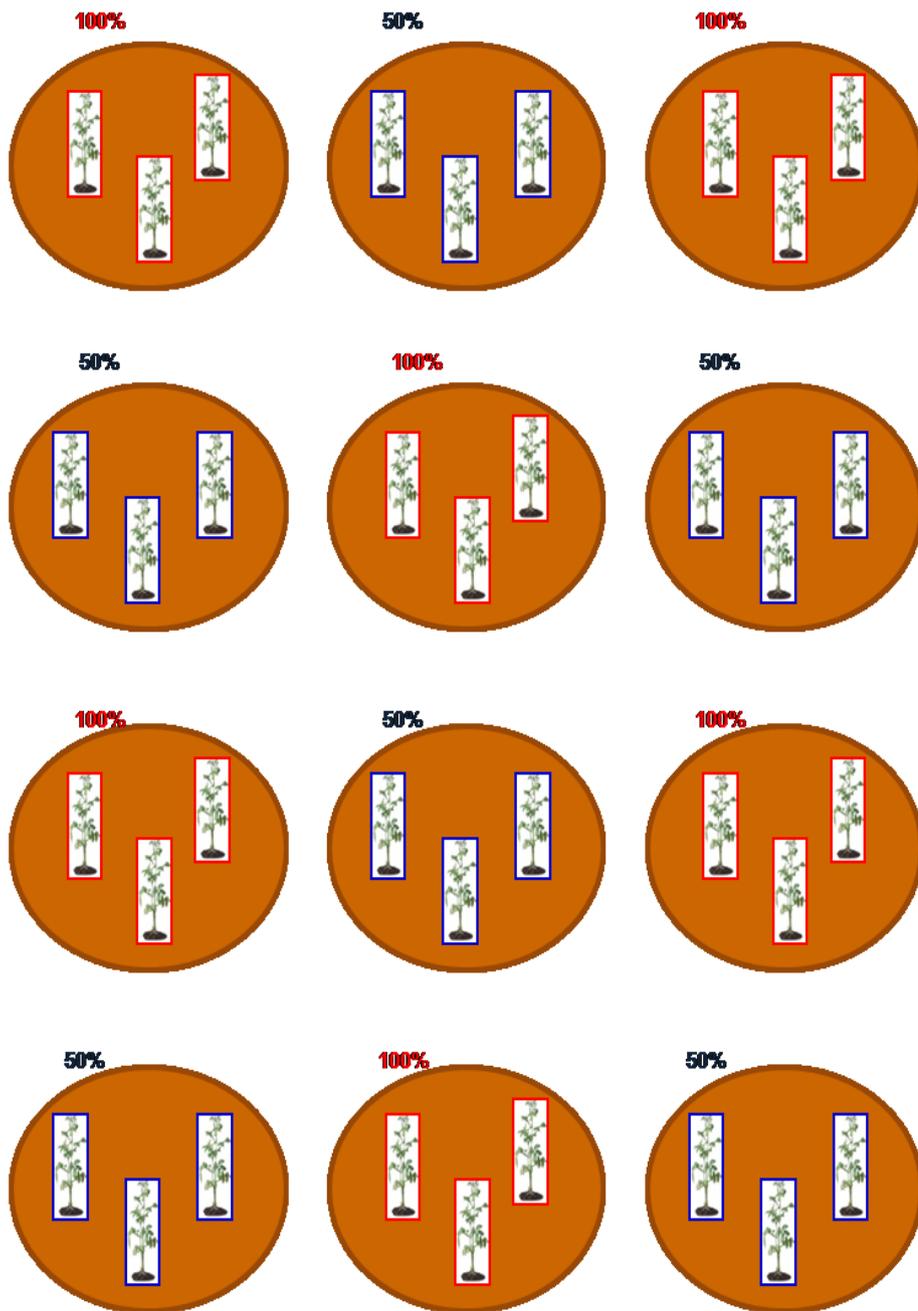


Figura 2.3. Schema di allevamento della IL9-2-5 e M82 a differenti apporti idrici.



Figura 2.4. Particolare dell'allevamento delle piante in condizioni semi-controllate a Portici nel 2011.

Tabella 2.1. Caratteristiche del suolo.

	Argilla	Limo	Sabbia Grossa	Sabbia Fine	Sabbia Totale	SOM	Carbonati
% media	5,8	15,8	42,9	35,4	78,3	0,69	n.d.

Tabella 2.2. Calcolo del Pedotransfert di Rawl e Brakensiek.

Sabbia %	Limo %	Argilla %	S.O. %	Densità kg dm ⁻³	CC % vol/vol	PA % vol/vol	AU % vol/vol	CC % p/p
78,3	15,8	5,8	0,69	0,902	17,68	7,33	10,35	0,21

Tabella 2.3. Esempio di calcolo utilizzato per stimare le quote di acqua da restituire a seconda del trattamento.

Trattamento %	PF G	PS g	Umidità misurata p/p	Differenza con rif p/p	Rif strato cm	Rif volume dm3	Rif Strato kg	Acqua perduta Litri	Acqua da restituire Litri
100	10,731	9,469	0,133	0,077	40	172,03	155,17	11,913	11,913
50	11,487	10,146	0,132	0,078	40	172,03	155,17	12,066	6,033

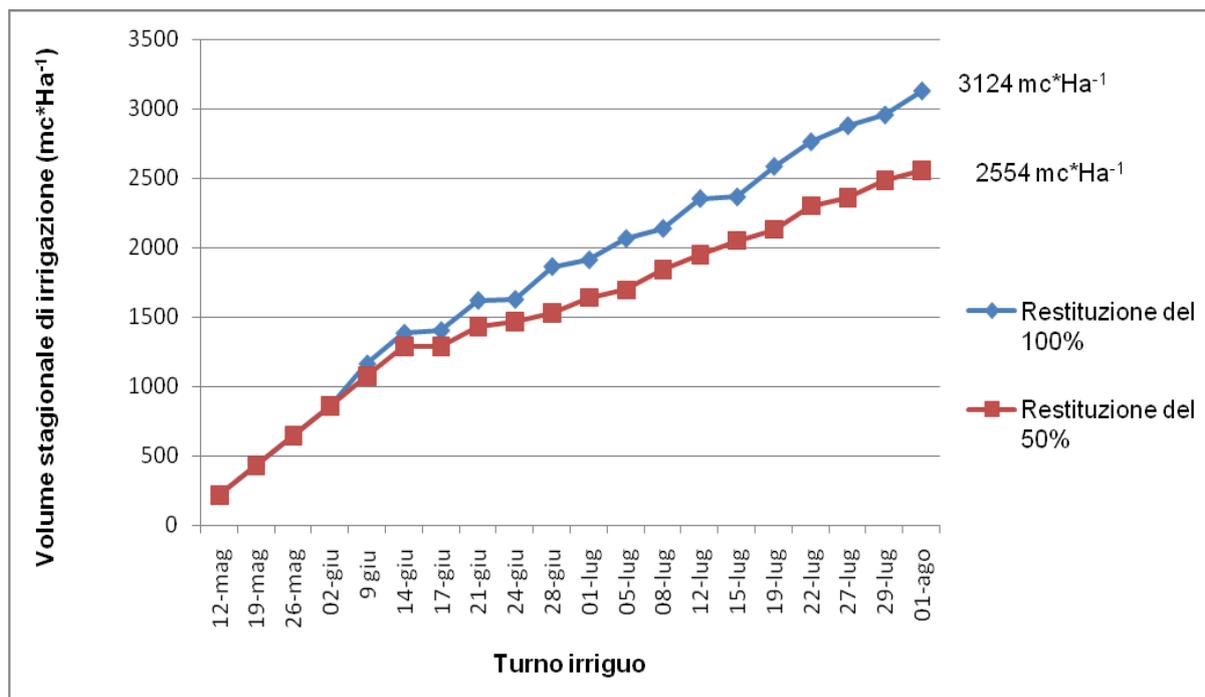


Figura 2.5. Consumi cumulativi di acqua per ciascun trattamento espressi in mc*Ha⁻¹ di terreno.

2.3. Misurazioni fenotipiche

2.3.1. Acido ascorbico

L'acido ascorbico (AsA) è stato misurato usando il metodo colorimetrico descritto da Stevens *et al.* (2006) con alcune modifiche. L'acido ascorbico (AsA) è stato misurato usando una versione modificata del metodo enzimatico descritto da Kampfenkel *et al.* (1995). Il saggio è basato sulla riduzione del Fe³⁺ a Fe²⁺ per mezzo dell'AsA e sul rilevamento spettrofotometrico del Fe²⁺ complessato con il 2,2'-dipiridilio.

Ad 1 g di campione congelato a -80°C e ridotto in polvere sono stati aggiunti 600 µL di acido tricloroacetico (TCA) al 6% freddo in una eppendorf da 2 mL. I campioni sono stati vortexati per 10 s e lasciati in ghiaccio per 15 min. Sono stati, quindi, centrifugati a 4°C per 15 min a 25000xg. 20 µL di surnatante sono stati utilizzati come campione per saggiare il contenuto di acido ascorbico. Due differenti saggi sono stati eseguiti per la determinazione, rispettivamente, dell'AsA totale e dell'AsA ridotto.

Inoltre, due rette di taratura, l'una per la determinazione dell'AsA totale e l'altra per la determinazione dell'AsA ridotto sono state costruite utilizzando delle soluzioni

standard di acido ascorbico in TCA al 6 %, contenenti rispettivamente 0, 5, 10, 15, 20, 30 e 100 nmol in un volume di 20 μ L.

AsA totale

20 μ L di campione o di standard sono stati distribuiti in tre pozzetti per le tre repliche. 20 μ L DTT 5 mM (diluito in buffer fosfato 0.4 M, pH 7.4) sono stati aggiunti per ridurre l'ascorbato ossidato. I campioni sono stati incubati per 20 min a 37 °C. Dieci μ L di N-ethyl maleimide (NEM; 0.5% v/v in H₂O) sono stati aggiunti alla reazione che è stata quindi agitata e lasciata per 1 min a temperatura ambiente. Quindi, sono stati aggiunti 80 μ L di Reazione Colorante (RC) ad ogni campione e incubati per 40 min a 37 °C.

La soluzione di Reagente Colorante (RC) è stata ottenuta aggiungendo 2.75 parti di soluzione A ed 1 parte di soluzione B. La composizione delle soluzioni A e B è di seguito riportata:

solution A

31% di Acido Ortofosforico

4.6% v/v di TCA

0.6% v/v di cloruro ferrico

solution B

4% di 2,2-dipyridyl (disciolto in etanolo al 70%)

AsA ridotto

20 μ L di campione o di standard sono stati distribuiti in tre pozzetti per le tre repliche. 20 μ L di Buffer fosfato (PB) a pH 7,4 e 10 μ L di acqua bd sono stati aggiunti ad ogni campione. Quindi, sono stati aggiunti 80 μ L di Reazione Colorante (RC) ad ogni campione e incubati per 40 min a 37 °C. La Reazione Colorante (RC) è stata ottenuta come descritto sopra.

Per la lettura spettrofotometrica il campione, in entrambi i saggi, è stato addizionato con 900 μ L di acqua e sottoposto a lettura a 525 nm utilizzando il Nanophotometer (Implein). La concentrazione di AsA è stata espressa in mg*100 g⁻¹ di peso fresco (PF) utilizzando le due curve standard disegnate su un range dinamico da 0 a 100 nmol AsA.

L'equazione ottenuta per l'AsA totale è: $y(\text{Abs}) = 0,0118x - 0,0222$

E per l'AsA ridotto è: $y(\text{Abs}) = 0,0115x - 0,0231$

2.3.2. *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. L'estratto è stato posto su ghiaccio per 3 minuti al buio e poi agitato. L'estratto è stato poi trasferito in un tubo da 15 mL e il volume portato a 5 mL con l'aggiunta di metanolo al 60%. I campioni sono stati quindi centrifugati a 3000 g per 5 minuti. Quindi 62.5 µl di surnatante sono stati aggiunti a 62.5 µl di reagente Folin-Ciocalteu's (Sigma) e 250 µl di acqua deionizzata e incubati per 6 minuti. Dopo l'aggiunta di 625 µl di carbonato di sodio al 7.5% e 500 µl di acqua deionizzata, i campioni sono stati incubati per 90 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata misurata a 760 nm. La concentrazione fenolica totale è stata espressa in µg di acido gallico equivalenti mg⁻¹ di PF, utilizzando la curva standard disegnata su un range dinamico compreso tra 0 e 125 µg Acido Gallico Equivalente (AGE) e qui di seguito riportata:

$$\mu\text{g AGE mg}^{-1} \text{ PF} = [(\text{Abs} + 0.0776) / 0.023] / 3.125 \text{ mg} \quad (R^2 = 0.999)$$

2.3.3. *Solidi solubili totali*

Il contenuto di solidi solubili del succo ricavato spremendo il frutto è stato misurato con un rifrattometro portatile ATAGO Modello ATC-1 ed espresso su una scala di gradi Brix. Per ogni genotipo è stata considerata una media di 10-20 misurazioni.

2.3.4. *Carotenoidi e Clorofille*

Il contenuto delle clorofille *a* e *b* e dei carotenoidi nei frutti maturi di pomodoro è stato determinato mediante il metodo di Hartmut et al, 1983. 100 mg di tessuto ridotto in polvere e conservato a -80°C sono stati stemperati con mortaio e pestello in 1 mL di etanolo al 96% contenenti 0,3 mg mL⁻¹ di CaCO₃. I campioni sono stati, poi, posti in ghiaccio e al buio. Gli estratti così ottenuti sono centrifugati a 13.000g per 5 minuti a 4°C. Il contenuto delle clorofille è stato determinato spettrofotometricamente misurando

l'assorbanza (A) a 665 e 649 nm, rispettivamente per la clorofilla *a* (Ca) e *b* (Cb), e a 470 nm per i carotenoidi (Ccar) secondo le seguenti equazioni:

$$Ca (\mu\text{g}) = 13.95 \times A_{665} - 6.88 \times A_{649}$$

$$Cb (\mu\text{g}) = 24.96 \times A_{649} - 7.32 \times A_{665}$$

$$Ccar (\mu\text{g}) = (1000 A_{470} - 2.05 \times Ca - 114.8 Cb)/245$$

2.3.5. Glutathione

Il Glutathione è il principale tiolo intracellulare a basso peso molecolare che gioca un ruolo critico nella cellula, per difendere i tessuti dallo stress ossidativo. Per verificarne la concentrazione nei frutti di pomodoro, nel presente lavoro di tesi, è stato utilizzato il kit della *BioVision: "Glutathione Detection Kit"* che prevede un unico metodo per stimare contemporaneamente le concentrazioni di Glutathione ridotto (GSH), ossidato (GSSG) e totale. Nel saggio l'O-phthalaldehyde (OPA) reagisce con il GSH (non con il GSSG), generando un composto fluorescente e quindi in grado di emettere luce visibile quando colpito da luce UV. La misurazione dell'intensità della fluorescenza mediante fluorimetro multipiastra (*Multilabel Counter Victor-2*, WALLAC 1420) ha consentito di stimare la concentrazione di GSH. Aggiungendo un agente riducente al campione si ottiene la conversione del GSSG a GSH ed il successivo saggio con l'OPA consente di stimare la quantità di Glutathione totale (GSH + GSSG). Per misurare la quantità di GSSG, invece, viene aggiunto il GSH *Quencher* per rimuovere la presenza di GSH, e quindi l'agente riducente è per eliminare l'eccesso di *Quencher* e convertire il GSSG in GSH. In questo modo, il GSSG può essere quantificato mediante l'uso del fluorescente OPA. Il saggio è stato condotto secondo la procedura suggerita dalla BioVision (www.biovision.com).

2.4. Caratterizzazione morfologica dell'apparato radicale

La caratterizzazione morfologica comparativa dell'apparato radicale nei due genotipi di interesse è stata eseguita parallelamente in tre sistemi differenti: 1) plantule ottenute da semi germinati su carta bibula; 2) plantule ottenute da germinazione *in vitro* e 3) piante allevate in vaso all'interno di una serra.

Plantule ottenute da semi germinati su carta bibula

Dieci semi per Il 9-2-5 e per M82 sono stati fatti germinare su dischetti di carta in piastre Petri e incubati in camera di crescita a 25°C al buio fino alla germinazione. Le plantule sono state poste a crescere su carta bibula. La carta bibula è stata inserita in un plexiglas (1 m x 0.7 m) e quest'ultimo è stato posto in verticale in una vasca contenente la soluzione per idroponica. I plexiglas sono stati tenuti al buio e in camera di crescita a 25°C. In tal modo le radici si sono potute sviluppare in lunghezza e larghezza. La soluzione di idroponica è costituita da:

<u>Componenti</u>	<u>Volume per 1L</u>
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	708.45 mg
MgSO ₄ *7H ₂ O	492.94 mg
KH ₂ PO ₄	136.09 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	396.39
CaCl ₂ *2H ₂ O	441.09 mg
H ₃ BO ₃	2.868 mg
MnSO ₄ *H ₂ O	1.545 mg
EDTA-Fe 0.1M	1.1109 mL
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.22 mg
CuSO ₄ *5H ₂ O	0.08 mg
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.0299 mg
K ₂ SO ₄	348.5 mg

Plantule ottenute da germinazione in vitro

Dieci semi per Il 9-2-5 e per M82 sono stati fatti germinare su un substrato solido Murashige & Skoog (1962) arricchito di saccarosio 20g/l. I semi sono stati posti in camera di crescita a 25°C. Le radici delle plantule sono state osservate a 21 e 40 gg dalla germinazione. In particolare le radici sono state isolate dal mezzo di coltura e ne è stata acquisita l'immagine.

Piante allevate in vaso all'interno di una serra

Dieci semi per Il 9-2-5 e per M82 sono stati fatti germinare in vasi dal diametro di 20 cm contenente suolo sterilizzato e fertilizzato. I vasi sono stati posti in serra. Le radici delle piante sono state osservate a 30 gg dalla germinazione. In particolare le radici sono state isolate dalle particelle di suolo e ne è stata acquisita l'immagine.

Le immagini delle radici di tutti e tre i sistemi sono state acquisite con lo scanner. Il software *ImageJ* ha consentito di elaborare l'immagine in modo da poter misurare la lunghezza delle radici. Le radici sono state distinte in due gruppi principali: 1) Radice

Primaria; 2) Radici avventizie. La prima si sviluppa al di sotto del colletto, le seconde nella parte superiore del colletto. Sia le prime che le seconde possono sviluppare ulteriori ramificazioni dando vita a radici di II ordine. Se anche quest'ultime presentano ramificazioni sono dette radici di III ordine e così via.

2.5. *Analisi statistica dei dati fenotipici*

I dati fenotipici raccolti sono stati analizzati mediante test parametrici ed utilizzando il software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versione 17. Il test t di Student è stato utilizzato per verificare l'effetto del genotipo entro il trattamento; l'analisi ANOVA è stata utilizzata per verificare l'effetto del genotipo e l'interazione con i trattamenti, ed il modello "ANOVA per misure ripetute", per verificare l'effetto del genotipo sull'andamento come combinazione lineare di trattamenti.

2.6. *Analisi trascrittomica*

2.6.1. *Estrazione dell'RNA*

L'RNA totale è stato isolato da frutti di pomodoro conservati a -80°C e ridotti in polvere secondo la procedura di Griffiths e collaboratori (1999). Approssimativamente 4 g di campione macinato sono stati aggiunti a 12 mL di Buffer di Estrazione (Soluzione A; tab. 2.4) e a 15 mL di fenolo/cloroformio (1:1) (Soluzione B; tab. 2.4) in tubi di Oakridge. I tubi sono stati vigorosamente agitati e poi centrifugati a 10000 rpm (15 minuti, temperatura ambiente). La fase acquosa è stata completamente prelevata e trasferita in un nuovo tubo Oakridge e sono stati aggiunti 15 mL di fenolo/cloroformio (1:1) (Soluzione B). I tubi sono stati, di nuovo, vigorosamente agitati e poi centrifugati a 10000 rpm (15 minuti, temperatura ambiente). 11 mL della fase acquosa sono stati trasferiti in un nuovo tubo Oakridge, quindi l'acido nucleico è stato precipitato nella fase acquosa per 1 ora a -20°C con l'aggiunta di 27,5 mL di etanolo (100%) freddo e di 1,1 mL di sodio acetato 3 M (pH 6.0). Successivamente ad una centrifugazione a 10000 rpm (15 minuti, 4 °C) il pellet è stato lavato con 15 mL di etanolo al 70%. I campioni sono stati ridisciolti in 2 mL di 2X Buffer di Estrazione CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Soluzione C; tab. 2.4). Gli acidi nucleici sono stati precipitati con l'aggiunta di 4 mL di Buffer di Precipitazione CTAB (Soluzione D; tab. 2.4) e centrifugati a 10000 rpm (30 minuti a

temperatura ambiente). Il pellet è stato ri-sospeso in 400 µl di NaCl 1,4 M, seguito dall'aggiunta di 1 mL di etanolo 100% freddo e precipitato a -20°C over-night. I campioni sono stati poi centrifugati alla massima velocità (10 minuti, 4 °C), i pellet lavati in 1 mL di etanolo al 70% ri-sospesi in 400 µl di acqua-DEPC e incubati a 50 °C per 5 minuti. 400 µl di fenolo/cloroformio (Soluzione B) sono stati aggiunti e la sospensione vortexata e centrifugata per 15 minuti. La fase acquosa è stata trasferita in un tubo pulito ed il trattamento ripetuto. L'acido nucleico è stato precipitato aggiungendo un volume di 0,1 volumi di sodio acetato 3 M (pH 6.0) e 3 volumi di etanolo (100%) freddo per tutta la notte a -20 °C. I campioni sono stati lavati con 1 mL di etanolo al 70%. Il pellet è stato così ridisciolti in 180 µl di acqua-DEPC, successivamente sono stati aggiunti 20 µl di RQ1 DNase Reaction Buffer (Soluzione E; tab. 2.4) e 1 µl di RQ1 DNase (Promega) e poi incubati a 37°C per 30 minuti. I campioni di RNA ottenuti sono stati utilizzati per l'analisi spettrofotometrica allo scopo di verificare la concentrazione e la purezza e conservati a -80 °C. in particolare la purezza del RNA è stata determinata usando il *Nanophotometer* (Implein) e l'integrità è stata confermata usando un *Nano Bioanalyzer* AGILENT 2100 con un nano chip 6000.

Tabella 2.4. Composizione delle soluzioni utilizzate per l'estrazione del RNA totale.

Buffer di Estrazione del RNA (Soluzione A)

6% (w/v) acido 4-aminosalicilico
1% (w/v) acido 1,5-naftalenedisulfonico
50mM Tris-HCL pH 8.3
5% (w/v) Soluzione Fenolo

Soluzione Fenolo

100 g di Fenolo in cristalli
14 mL m-cresolo
0.1 g 8-idrossi-chinolina
30 mL acqua trattata DEPC

Soluzione Fenolo/Cloroformio (Soluzione B)

500 g Fenolo in cristalli
0.5 g 8-idrossi-chinolina

500 mL Cloroformio
20 mL alcool Iso-amilico
200 mL 100mM Tris-HCL pH 8.0

2X CTAB Buffer di Estrazione (Soluzione C)

1.4 M NaCl
2% (w/v) CTAB
0.1 M Tris-HCL pH 8.0
20 mM EDTA pH 8.0

CTAB Buffer di Precipitazione (Soluzione D)

1% CTAB (w/v)
50 mM Tris-HCL pH 8.0
10 mM EDTA pH 8.0
10X RQ1 DNasi Buffer di Reazione (Soluzione E)
400 mM Tris-HCL pH 8.0
100 mM MgSO₄
10 mM CaCl₂

2.6.2. Sintesi dell'RNA antisenso

L'aRNA è stato sintetizzato usando il KIT KREATECH ULS™ RNA ampULSe: *Amplification and Labelling Kit for Combimatrix arrays* (Kreatrech) e marcato con dye fluorescente ULS-dye Cy5. In particolare, nel primo step è stato sintetizzato il cDNA. In un tubo da 1.5-mL RNase-free, è stato aggiunto:

<u>Componenti</u>	<u>Campione</u>
1 µg of mRNA	10 µl
T7-Oligo(dT) Primer	1 µl
Acqua-DEPC	to 12 µl

La mix è stata incubata a 70°C per 10 minuti e poi raffreddata su ghiaccio per 1 minuto, quindi centrifugata brevemente per raccogliere tutto il contenuto. Dopo ciò è stato aggiunto:

<u>Componenti</u>	<u>Volume</u>
-------------------	---------------

10X First-Strand buffer	2 μ l
dNTP Mix	4 μ l
RNase Inhibitor	1 μ l
Array Script	1 μ l
Volume di reazione finale	20 μ l

Il tubo è stato centrifugato brevemente e poi incubato prima a 42°C per 2 ore. Dopo l'incubazione è stata effettuata la sintesi del secondo filamento del cDNA. Al tubo posto in ghiaccio è stato aggiunto:

<u>Componenti</u>	<u>Campione</u>
Acqua-DEPC	63 μ l
10X Second-Strand buffer	10 μ l
dNTP Mix	4 μ l
DNA Polimerasi I	2 μ l
RNasi H	1 μ l
Volume totale	100 μ l

La miscela di reazione è stata incubata a 16°C per 2 ore, e poi posta in ghiaccio. Per purificare il cDNA sono stati aggiunti 250 μ l di Binding Buffer nel tubo di reazione poi la miscela è stata caricata direttamente all'interno del Filter Cartridge wash tube. I campioni sono stati quindi centrifugati a 10000 g a temperatura ambiente per 1 minuto e il surnatante è stato eliminato. Il cDNA è stato lavato con 500 μ l di Wash Buffer seguito da due centrifugazioni a 10000 g e a temperatura ambiente per 1 minuto. Per eluire il cDNA sono stati aggiunti 10 μ l di *Nuclease-free water*, preriscaldata, e l'incubazione è stata completata a temperatura ambiente per 2 minuti. Alla fine, i campioni sono stati centrifugati a 10000 g a temperatura ambiente per 1,5 minuti per raccogliere il cDNA purificato. Per ottenere l'arRNA la trascrizione in vitro è stata effettuata aggiungendo i seguenti componenti a temperatura ambiente:

<u>Componenti</u>	<u>Campione</u>
Double-stranded cDNA in <i>Nuclease-free water</i>	16 μ l
T7 rNTP mix (75 mM)	16 μ l
T7 10X Reaction Buffer	4 μ l
T7 Enzyme Mix	4 μ l

Volume totale 40 μ l

I campioni sono stati incubati a 37°C per 14 ore. E' stato aggiunto 100 μ l di *Nuclease-free water* per fermare la reazione. Per purificare l'aRNA è stato aggiunto 350 μ l di aRNA Binding Buffer a ogni campione e 250 μ l di etanolo al 100%. Ogni campione è stato poi inserito nei aRNA Filter Cartridge tube e centrifugato per 1 minuto a 10000g. Il surnatante è stato eliminato e sono stati aggiunti 650 μ l di Wash Buffer, successivamente è stata effettuata una centrifugazione a 10000 g per 1 minuto. E' stato eliminato il surnatante e aggiunti 650 μ l di etanolo 80%. I campioni sono stati centrifugati per 1 minuto a 10000g e il surnatante è stato eliminato. Si ripete una centrifugazione da 1 minuto a 10000g per asciugare il filtro e si trasferisce il filtro in un nuovo tubo. Al centro del filtro si aggiungono 100 μ l di *Nuclease-free water* preriscaldata e si lascia ad incubare a temperatura ambiente per 2 minuti, quindi si centrifuga a 10000g 2 minuti. 5 μ g di aRNA sono stati marcati con ULS-Dye Cy5. Per purificare l'aRNA legato al colorante è stato utilizzato il protocollo Kreatech che utilizza le colonnine KREApure.

2.6.3. Disegno del chip

Il chip TomatoArray1.0 è stato sintetizzato su piattaforma Combimatrix presso la Piattaforma di Genomica Funzionale della Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali dell' Università di Verona. Il chip TomatoArray1.0 contiene 90k elettrodi di silicio che supportano 20200 sonde di DNA sintetizzate *in situ* con 4 repliche. Ogni sonda consiste di oligonucleotidi di 35 mer disegnati per essere specifici per ognuno dei diversi Tentative Consensus (TC) derivanti dal TIGR *S. lycopersicum* Gene Index Release 11.0 (June 21, 2006). Come controllo negativo sono state utilizzate nove sequenze oligonucleotidiche fornite da Combimatrix. Il Custom Array™ 90K è stato disegnato con 4 repliche per ogni sonda, ognuna distribuita casualmente all'interno dell'array per permettere anche la stima della variabilità all'interno dell'esperimento.

2.6.4. Ibridazione e analisi dell'immagine

L'aRNA marcato è stato ibridizzato sul TomatoArray 1.0. I chip sono stati pre-ibridizzati, in un fornetto per ibridazione, per 30 minuti a 45°C con una Soluzione di Pre-ibridazione (Soluzione A; tab. 2.5). I chip poi sono stati immersi in una camera d'ibridazione con una Soluzione di Ibridazione (Soluzione B; tab. 2.5) e incubati per 14 ore a 45°C in un fornetto di ibridazione. Dopo l'ibridazione i chip sono stati lavati con

differenti Soluzioni di lavaggio (Soluzione C, D, E; tab. 2.5) fino al lavaggio finale con Soluzione di lavaggio PBST (Soluzione F) e incubati a temperatura ambiente per 1 minuto. Sono state effettuate tre repliche d'ibridazione per ogni genotipo - M82, IL 9-2-5 del I Anno - per tre trattamenti (0-50-100% in contenuto idrico) per un totale di sei repliche per genotipo. In particolare ogni replica per genotipo è stata effettuata usando RNA estratto da frutti derivanti da una singola pianta. I chip sono stati quindi scannerizzati usando uno scanner Perkin Elmer ScanArray 4000 XL e il software di acquisizione ScanArray Express Microarray Analysis System Version 4.0 secondo le istruzioni del costruttore. Per maggior dettagli vedere CustomArray® 90K Microarray - Hybridization and Imaging Protocol (PTL020) disponibile al sito http://www.combimatrix.com/support_docs.htm.

Tabella 2.5. Composizione delle soluzioni utilizzate per l'estrazione del RNA totale

<u>Soluzione di Pre-Ibridazione (Soluzione A)</u>	<u>Volume per 120 µl</u>
2X Ib Soluzione stock ^a	60 µl
Acqua Nucleasi-free	41 µl
50X soluzione di Denhart	12 µl
Salmon sperm DNA (10 mg mL ⁻¹)	1 µl
1% SDS	6 µl
<u>^a2X Ib Soluzione stock</u>	<u>Volume per 10 mL</u>
20X SSPE	6 mL
10% Tween-20	100 µl
0.5 M EDTA	560 µl
Acqua Nucleasi-free	3.34 mL
<u>Soluzione di Ibridazione (Soluzione B)</u>	<u>Volume per 120 µl</u>
2X Ib Soluzione stock ^a	60 µl
DI Formamide	30 µl
RNA marcato	10 µl

Salmon sperm DNA (10 mg mL ⁻¹)	1 µl
1% SDS	5 µl
Acqua Nucleasi-free	a 120 µl

<u>6X SSPET Soluzione di lavaggio (Soluzione C)</u>	<u>Volume per 10 mL</u>
20X SSPE	3 mL
10% Tween-20	50 µl
Acqua Nucleasi-free	6.95 mL

<u>3X SSPET Soluzione di lavaggio (Soluzione D)</u>	<u>Volume per 10 mL</u>
20X SSPE	1.5 mL
10% Tween-20	50 µl
Acqua Nucleasi-free	8.45 mL

<u>0.5X SSPET Soluzione di lavaggio (Soluzione E)</u>	<u>Volume per 10 mL</u>
20X SSPE	250 µl
10% Tween-20	50 µl
Acqua Nucleasi-free	9.7 mL

<u>PBST Soluzione di lavaggio (Soluzione F)</u>	<u>Volume per 10 mL</u>
10X PBS	2 mL
10% Tween-20	100 µl
Acqua Nucleasi-free	7.9 mL

2.6.5. Estrazione dei dati, normalizzazione e filtrazione

Dopo la scansione microarray, le immagini TIF sono state processate per generare dati numerici utilizzando CombiMatrix Microarray Imager Software versione 5.8.0 copy@right 2001. La Quick Start Guide o il manuale utente Microarray Imager è disponibile al sito web <https://webapps.combimatrix.com>. Le mediane e le deviazioni

standard dei segnali delle sonde sono state successivamente importate nel software SPSS.

La normalizzazione tra gli array è stata ottenuta correggendo la mediana di ogni sonda con il rapporto tra le mediane degli array e la media delle mediane degli array stessi. Successivamente alla normalizzazione dei dati e al controllo della qualità tutti i valori sono stati trasformati in log (log in base 2). In conclusione, i segnali delle sonde aventi un coefficiente di variabilità più alto di 0.5, così come le sonde spikes e factory, sono state eliminate. Quindi le sonde che mostravano un aumento o una diminuzione del 10% dell'intensità del segnale sono state eliminate.

L'annotazione funzionale e l'assegnazione delle sequenze dei Tentative Consensus sulle mappe dei *pathway* metabolici sono state ottenute tramite i tools bioinformatici del pacchetto Blast2Go (<http://www.blast2go.org/>).

2.6.6. *Analisi statistiche e procedure bioinformatiche*

I segnali differenzialmente espressi sono stati identificati usando il modulo t-test contenuto all'interno del software TMEV (*TIGR Multiple Experiment Viewer*) versione 4.4.0 (<http://www.tigr.org/software/tm4/> - Saeed *et al.*, 2003). In particolare per comparare i profili trascrizionali della linea IL 9-2-5 con il controllo M82 è stata stabilita una soglia di significatività di $P < 0.01$ (Tusher *et al.*, 2001). Per analizzare le coregolazioni esistenti tra i segnali differenzialmente espressi è stato prodotto un clustering gerarchico utilizzando la correlazione di Pearson. Le sequenze dei Tentative Consensus che hanno mostrato espressione differenziale sono state utilizzate come input per il software Blast2GO (<http://blast2go.bioinfo.cipf.es/> - Conesa *et al.*, 2005). Quindi i TC sono stati annotati, categorizzati e mappati per ontologie. Le sequenze che non sono state automaticamente annotate nel database NR (*non-redundant*) dell'NCBI sono state processate manualmente utilizzando il tool di ricerca per similarità SGN Blast (<http://sgn.cornell.edu/tools/blast/>). In ogni caso come valore soglia dell'e-value atteso è stato considerato 10^{-10} .

2.7. *Validazione qRT-PCR*

I profili di espressione dei TC considerati punti chiave nel meccanismo di regolazione del contenuto in antiossidanti nella bacca di pomodoro in risposta alla

riduzione dell'acqua restituita sono stati validati tramite Real-Time quantitativa mediante 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). L'amplificazione è stata condotta in un volume di reazione di 12.5 μ l utilizzando una *Power SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems). La quantificazione relativa è stata stimata usando il modello $\Delta\Delta C_t$. Le coppie di primer (tab. 2.6) sono state disegnate utilizzando il software *Primer Express*. Come regione di matching è stata considerata l'ORF più lunga e come lunghezza ideale dell'amplicone 50-150 bp. Le coppie di primer sono state validate usando la curva standard ottenuta in un range di diluizione da 1 a 10^{-3} ($R^2 > 0.98$ e pendenza di -3.3). Per ciascun TC sono state considerate tre repliche biologiche per ogni trattamento e per ogni esperimento sono state effettuate tre repliche tecniche. Come campione calibratore è stato utilizzato un campione cDNA normalizzato, ottenuto mediante addizione di quantità equimolari delle tre repliche biologiche del genotipo M82 con il trattamento 100%. Come gene endogeno è stato utilizzato l'*Elongation Factor 1* (EF1).

Tabella 2.6. Coppie di Primer usate nelle RT-PCR per la convalida dei geni coinvolti nell'accumulo di AsA che sono differenzialmente espressi in IL 9-2-5 e M82. Annotazione di TIGR 2.11.

Trascritto	Sequenza	Annotazione
ID_05349 Fw ID_05349 Rv	5'-CAAGAGAGAGACCACCGGAGC-3' 5'-TGAATGGGTGGTTGTTGGGT-3'	GDP-L-Galactose Phosphorylase
ID_06959 Fw ID_06959 Rv	5'-GATTCCGAACCTAGCGCAGA-3' 5'-TCACGCTCCTCATAGAAGCCA-3'	GDP-mannose pyrophosphorylase
ID_03191 Fw ID_03191 Rv	5'-CTGCCAAAGAACCTGCACTG-3' 5'-AAGCCAATCAGCCATGAGCT-3'	Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase
ID_07204 Fw ID_07204 Rv	5'- GATCTGGACAAGCTAGCAACATCA-3' 5'-CGTCTTGCATTTCCACATTCAG-3'	Polygalacturonase
ID_07570 Fw ID_07570 Rv	5'-GCCGAGGCAGGAACCTATTC-3' 5'-CCCGCACATGTTTCTCCAC-3'	UDP-glucose 6-dehydrogenase
ID_00476 Fw ID_00476 Rv	5'-GGCAATTAACGACGAGGCAC-3' 5'-GGCTCCGTTCCGTTGTTAAAC-3'	cell-wall invertase LIN5
ID_01351Fw ID_01351 Rv	5'-TCATTCAGCCGTGAGTGAC-3' 5'-TGTCGTGTTTGAGAGCCACTG-3'	er degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1
ID_01931Fw ID_01931 Rv	5'-CACAACCTATTCAAAGGGCAAG-3' 5'- TGTTTTGAAGAACGCATCTGTC-3'	Monodehydro Ascorbate Reductase
ID_06018Fw ID_06018 Rv	5'-CACTCTCTTGGCAGTTCTATGG -3' 5'-CAAGAAATCCCCAAAATGGA -3'	Monodehydro Ascorbate Reductase
ID_07455Fw ID_07455 Rv	5'-GGTGTCACCAAAACCCAATACA -3' 5'- GAGTGGACCCATTGCCA -3'	ABA 8'-hydroxylase CYP707A1
ID_00515Fw ID_00515 Rv	5'- GCCGTCAGTCCATTTGACATG -3' 5'- CCAATGGCAAAGATTCCAGGTA -3'	Monodehydroascorbate reductase (MDAR)
ID_04338 Fw ID_04338 Rv	5'- GGTACAAGGAAAACGGCATTGA -3' 5'- GGTTATGGTTTCACCGTTGC -3'	Probable monodehydroascorbate reductase, cytoplasmic isoform 2 (MDAR 2)
ID_27416 Fw ID_27416 Rv	5'- TCGAGGTGGCTCTTGGACAC -3' 5'- TCAAGCTTTCAGGCACACTCC -3'	Dehydroascorbate reductase
ID_28156 Fw ID_28156 Rv	5'- CCCCAAGTTTGTGCTTTCC -3' 5'- CTCTGTTCCATCACCGGAGTC-3'	Dehydroascorbate reductase
ID_26588 Fw ID_26588 Rv	5'- CGATGCCAAAGCACCATTTT -3' 5'- GGGTGCTCGAACTTCGTGG -3'	Dehydroascorbate reductase
ID_22642 Fw ID_22642 Rv	5'- TTGCGAACCAACCATAGCC -3' 5'- GTTGAGCTCGATGCTTCTGCT -3'	Dehydroascorbate reductase

3. Risultati

3.1 Caratterizzazione della produttività delle linee IL 9-2-5 ed M82 allevate a due differenti livelli di disponibilità di acqua

I genotipi IL9-2-5 ed M82 sono stati sottoposti a due prove comparative, rispettivamente nel 2009 e nel 2011, nel corso delle quali le piante sono state allevate in sistemi semi-controllati a due differenti livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata ed i frutti prodotti sono stati raccolti e valutati. In particolare, i due trattamenti idrici sono consistiti rispettivamente nella restituzione dell'intero ammontare di acqua perduta (100%) e nella restituzione della metà dell'acqua perduta (50%) rispetto alla capacità di campo a partire dal momento in cui il 50% delle piante hanno mostrato le prime evidenze di allegagione sui palchi basali. Nel primo esperimento, condotto presso l'Università di Bari nel 2009, il trattamento corrispondente alla restituzione dell'acqua alla capacità di campo ha dato luogo ad un consumo di acqua, riferito alla superficie, di 1280 mq/Ha^{-1} mentre il trattamento 50% ha dato luogo ad un consumo di 480 mq/Ha^{-1} . Nel secondo esperimento, invece, condotto presso l'Università di Portici nel 2011, il consumo stimato di acqua corrispondente al trattamento 100% è stato di 3124 mq/Ha^{-1} , mentre il consumo di acqua corrispondente alla prova 50% è stato di 2554 mq/Ha^{-1} . La differenza tra i due esperimenti in termini di consumo idrico è da attribuirsi principalmente ai differenti sistemi irrigui utilizzati ed alle differenti efficienze irrigue da essi generate.

3.1.1 Produzione quantitativa

Nelle Tabella 3.1 e 3.2 sono riportati i valori medi della produzione commerciabile e della produzione complessiva ottenute nell'ambito di ciascun esperimento, per ciascun genotipo e ciascun trattamento. In particolare, nel primo esperimento è stata osservata una produzione commerciabile media per pianta di 0,92 kg, mentre nel secondo esperimento la produzione commerciabile media per pianta è risultata di 0,45 kg. In termini di produzione commerciabile, nell'esperimento di Bari 2009 la linea M82 ha prodotto mediamente $1,3 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento 100% e $0,47 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento a 50%, mentre il genotipo IL9-2-5 ha prodotto mediamente $1,18 \text{ kg*pianta}^{-1}$ di frutti commerciabili nel trattamento 100% e nel trattamento 50% $0,72 \text{ kg*pianta}^{-1}$. Nel secondo esperimento (Portici, 2011), invece, la linea M82 ha prodotto mediamente $0,56 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento 100%

e $0,27 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento a 50%, mentre il genotipo IL9-2-5 ha prodotto mediamente $0,63 \text{ kg*pianta}^{-1}$ di frutti commerciabili nel trattamento 100% e nel trattamento 50% $0,35 \text{ kg*pianta}^{-1}$. Per quanto riguarda la produzione media complessiva per pianta, nel primo esperimento è stata osservata una produzione di $0,98 \text{ kg*pianta}^{-1}$, mentre nel secondo esperimento era di $0,60 \text{ kg*pianta}^{-1}$. In particolare, in termini di produzione media complessiva, nell'esperimento di Bari 2009 la linea M82 ha prodotto mediamente $1,36 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento 100% ed $0,49 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento a 50%, mentre il genotipo IL9-2-5 ha prodotto mediamente $1,34 \text{ kg*pianta}^{-1}$ di frutti commerciabili nel trattamento 100% e nel trattamento 50% $0,75 \text{ kg*pianta}^{-1}$. Nel secondo esperimento (Portici, 2011), invece, la linea M82 ha prodotto mediamente $0,69 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento 100% e $0,34 \text{ kg*pianta}^{-1}$ nel trattamento a 50%, mentre il genotipo IL9-2-5 ha prodotto mediamente $0,82 \text{ kg*pianta}^{-1}$ di frutti commerciabili nel trattamento 100% e nel trattamento 50% $0,57 \text{ kg*pianta}^{-1}$.

In tutti i casi studiati le differenze non statisticamente significative al test t di Student ($P < 0,05$), fatta eccezione per lo scarto osservato nel secondo esperimento.

Tabella 3.1. Media ed errore standard (ES) per caratteri bio-agronomici registrati sui genotipi M82 e IL9-2-5 allevati a 2 livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata (100% e 50%) nell'estate 2009 presso l'Università degli Studi di Bari.

	100%				50%			
	M82		IL9-2-5		M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Produzione frutti di scarto (g)	88,5	17,5	166,78	97,42	53		60,5	
Produzione commerciale (kg)	1,3	0,21	1,18	0,15	0,47	0,15	0,72	0,04
Produzione complessiva (kg)	1,36	0,24	1,34	0,2	0,49	0,18	0,75	0,01

Tabella 3.2. Media ed errore standard (ES) per caratteri bio-agronomici registrati sui genotipi M82 e IL9-2-5 allevati a 2 livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata (100% e 50%) nell'estate 2011 presso l'Università degli Studi di Napoli.

	100%				50%			
	M82		IL9-2-5		M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Produzione verde (kg)	0,12	0,05	0,1	0	0,05	0,03	0,07	0,01
Produzione commerciale (kg)	0,56	0,06	0,63	0,2	0,27	0,1	0,35	0,1
Scarto (kg)	0,02	0,01	0,09	0,07	0,02	0,01	0,15*	0,01
Produzione complessiva (kg)	0,69	0,05	0,82	0,26	0,34	0,07	0,57	0,09

*: differenza statisticamente significativa rispetto al genotipo M82 al test t di Student ($P < 0.05$)

La tolleranza dei genotipi di interesse ad una ridotta restituzione di acqua è stata espressa secondo l'Indice di Blum nell'ambito di ciascun esperimento sia per la produzione commerciabile che per la produzione complessiva (tab. 3.3). In particolare, per la produzione commerciabile è stato ottenuto un indice di Blum medio di 53,684. La linea IL9-2-5 ha fatto registrare un valore medio pari a 41,95, significativamente maggiore a quello ottenuto per la linea M82 (65,42). Analogamente, per la produzione complessiva si è avuto un indice di Blum medio di 53,76 (tab. 3.3), con valori significativamente maggiori nella IL9-2-5 rispetto ad M82.

Tabella 3.3. Indici di Blum calcolati per i genotipi M82 ed IL9-2-5 in condizioni di ridotta restituzione dell'acqua rispetto alla completa restituzione dell'acqua evapotraspirata.

Produzione	M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES
Commerciabile	65,42	1,42	41,95	2,84
Complessiva	61,66	1,94	45,85	1,43

*: differenza statisticamente significativa tra genotipi al test t di Student ($P < 0,05$)

3.1.2 Produzione qualitativa

Proprietà fisico-chimiche

Solidi solubili totali

Nell'esperimento del 2009, il contenuto di solidi solubili totali (°brix) dei frutti maturi ha mostrato un valore medio di 5,19 con un ES di 0,26. Il genotipo parentale

S. lycopersicum cv. M82, allevato alla capacità di campo, ha fatto registrare un valore medio di $4,06 \pm 0,48$ °brix, mentre la IL9-2-5 un valore medio di $4,86 \pm 0,07$ °brix (tab. 3.4). In condizioni ridotta restituzione di acqua (50%), il genotipo parentale M82 ha mostrato un contenuto medio in solidi solubili totali di $6,00 \pm 0,14$ °brix mentre la IL9-2-5 ha mostrato un valore medio di $5,85 \pm 0,35$ °brix (tab. 3.4). Inoltre, la differenza tra i due genotipi alla capacità di campo è risultata significativa al test t di Student ($P < 0,05$). Nel secondo esperimento (2011), il contenuto di solidi solubili totali (°brix) dei frutti maturi ha mostrato un valore medio di 8,71 con un ES di 0,33 (tab. 3.5). M82, allevato alla capacità di campo, aveva un valore di $7,14 \pm 0,33$ °brix e la IL9-2-5 aveva $8,93 \pm 0,18$ °brix. In condizioni ridotta restituzione di acqua (50%), M82 presentava un valore di $8,01 \pm 0,29$ °brix e la IL9-2-5 $9,19 \pm 0,19$ °brix. Non si notavano differenze statisticamente significative tra i genotipi e tra i trattamenti all'interno del genotipo.

Tabella 3.4. Espressione di caratteri fisico-chimici e nutrizionali nei frutti dei genotipi M82 e IL9-2-5 allevati a due livelli di restituzione di acqua (100% e 50%), Bari 2009.

	100%				50%			
	M82		IL9-2-5		M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Solidi Solubili totali °Brix	4,06	0,48	4,86*	0,07	6,00	0,14	5,85	0,35
Consistenza frutto Newton	19,74	0,59	24,13	2,59	31,72§	1,13	27,69*	1,24
AsA Tot $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF	92,40	18,64	103,99	15,05	97,97	15,16	100,04	0,27
AsA $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF	77,99	14,49	92,58	12,19	49,29	13,36	93,11*	3,98
Fenoli totali AGE eq $\cdot \text{mg}^{-1}$ PF	1,80	0,08	1,91	0,06	2,13§	0,10	1,94§	0,10
Carotenoidi $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ PF	0,70	0,07	0,62	0,07	0,87§	0,04	0,62*	0,00
Glutazione totale $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ PF	5,02	0,01	4,92	0,14	5,24	0,10	5,05	0,06
Glutazione ossidato $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ PF	4,98	0,01	4,87	0,14	5,19	0,10	5,00	0,07
Glutazione ridotto $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ PF	0,04	0	0,04	0,01	0,06§	0,01	0,05	0,01

*: tra genotipi t-Student $P < 0,05$ §: tra trattamenti test ANOVA $P < 0,05$ **Tabella 3.5.** Espressione di caratteri fisico-chimici e nutrizionali nei frutti dei genotipi M82 e IL9-2-5 allevati a due livelli di restituzione di acqua (100% e 50%), Portici 2011.

	100%				50%			
	M82		IL9-2-5		M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
°brix	7,14	0,66	8,93	0,18	8,01	0,29	9,19	0,19
consistenza	21,32	1,90	34,61	4,56	31,17§	2,31	27,69*	0,93

*: differenza statisticamente significativa tra genotipi al test t di Student ($P < 0,05$)§: differenza statisticamente significativa tra trattamenti al test ANOVA ($P < 0,05$)

Consistenza del frutto

Nell'esperimento del 2009 è stata rilevata una consistenza media dei frutti di $25,82 \text{ N*mm}^{-2}$ ed un ES di 1,39. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato alla capacità di campo, è stata misurata una consistenza media di $19,74 \pm 0,59 \text{ N*mm}^{-2}$, mentre nella IL9-2-5 la consistenza media è risultata essere pari a $24,13 \pm 2,59 \text{ N*mm}^{-2}$ nelle medesime condizioni di allevamento (tab. 3.4). In condizioni di ridotta restituzione di acqua (50%) il genotipo M82 ha mostrato incremento significativo ($P < 0,05$) della consistenza ($31,72 \pm 1,13 \text{ N*mm}^{-2}$) mentre nella linea IL9-2-5 la consistenza ha manifestato un incremento statisticamente non significativo ($27,69 \pm 1,24 \text{ N*mm}^{-2}$; tab. 3.4). Inoltre, la differenza in termini di consistenza del frutto maturo tra i due genotipi allevati restituendo il 100% dell'acqua perduta non è risultata essere significativa. Nel secondo esperimento (2011) è stata rilevata una consistenza media dei frutti di $31,15 \text{ N*mm}^{-2}$ ed un ES di 2,42. M82, allevato alla capacità di campo, mostrava una consistenza media di $21,32 \text{ N*mm}^{-2}$ ed un ES di 1,90, mentre la IL9-2-5 $34,61 \text{ N*mm}^{-2}$ ed un ES di 4,56. In condizioni di ridotta restituzione di acqua (50%) il genotipo M82 ha mostrato incremento significativo ($P < 0,05$) della consistenza ($31,17 \pm 2,31 \text{ N*mm}^{-2}$) mentre nella linea IL9-2-5 la consistenza ha manifestato un incremento statisticamente non significativo ($27,69 \pm 0,93 \text{ N*mm}^{-2}$; tab. 3.5).

Proprietà chimico-nutrizionaliAcido ascorbico

Nell'ambito del primo esperimento (2009), i frutti raccolti allo stadio rosso maturo dalle piante di M82 e IL9-2-5 allevate a differenti livelli di restituzione idrica sono stati valutati per contenuto in AsA

La concentrazione media di AsA Totale è stata $98,60 \pm 12,28 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato in condizioni di completa reintegrazione delle perdite di acqua, è stata misurata una concentrazione AsA Totale pari a $92,40 \pm 18,64 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, mentre la IL9-2-5 ha mostrato la concentrazione più alta pari a $103,99 \pm 15,05 \mu\text{g g}^{-1}$ PF (tab. 3.4). In condizioni di ridotta restituzione di acqua (50%), il valore di AsA Totale rilevato è stato mediamente di $97,97 \pm 15,16 \mu\text{g g}^{-1}$ PF in M82 e di $100,04 \pm 0,27 \mu\text{g g}^{-1}$ PF nella IL9-2-5.

Per quanto riguarda il contenuto in AsA ridotto, è stata osservata una concentrazione media pari a $78,24 \pm 11,01 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. Il genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato in condizioni di completa restituzione dell'acqua perduta, ha mostrato una concentrazione media di AsA di $77,99 \pm 14,49 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, mentre nella IL9-2-5 è stata osservata una concentrazione media più alta pari a $92,58 \pm 12,19 \mu\text{g g}^{-1}$ PF (tab. 3.4). In condizioni di ridotta reintegrazione delle perdite di acqua (50%), la concentrazione media inferiore di AsA è stata rilevata nel parentale M82 con $49,29 \pm 13,36 \mu\text{g g}^{-1}$ PF mentre nella IL9-2-5 la concentrazione media di AsA è risultata pari a $93,11 \pm 3,98 \mu\text{g g}^{-1}$ PF.

L'analisi statistica mediante il test t di Student ha evidenziato la non significatività delle differenze osservate tra i due genotipi nel trattamento con completa reintegrazione dell'acqua perduta, mentre le differenze tra i due genotipi sono risultate significative ($P < 0,05$) quando le piante sono state allevate in condizioni di reintegrazione del 50% dell'acqua perduta.

Fenoli totali

Il contenuto in fenoli totali nei frutti raccolti allo stadio rosso maturo nel corso del primo esperimento (2009) ha evidenziato una concentrazione media di $1,95 \pm 0,08 \mu\text{g}$ Acido Gallico Equivalente (AGE) mg^{-1} PF. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato normale con reintegrazione totale delle perdite di acqua, è stata ottenuta una concentrazione di $1,80 \pm 0,08 \mu\text{g AGE mg}^{-1}$ PF, mentre la IL9-2-5 ha mostrato una concentrazione pari a $1,91 \pm 0,06 \mu\text{g AGE mg}^{-1}$ PF (tab. 3.4). In condizioni di ridotta restituzione di acqua (50%), il valore più basso di fenoli totali è stato rilevato nella IL9-2-5 con $1,94 \pm 0,10 \mu\text{g AGE mg}^{-1}$ PF mentre nel parentale M82 era pari a $2,13 \pm 0,10 \mu\text{g AGE mg}^{-1}$ PF. Inoltre, il test t di Student ha evidenziato la non significatività delle differenze tra i due genotipi in termini di contenuto in fenoli totali sia in condizioni di completa reintegrazione sia in condizioni di reintegrazione parziale delle perdite di acqua. Per contro, l'incremento in fenoli totali al diminuire delle restituzioni di acqua operate è risultato significativo al test t di Student per ciascuno dei due genotipi confrontati ($P < 0,05$).

Carotenoidi

I frutti raccolti nell'ambito dell'esperimento del 2009 hanno mostrato un contenuto medio in carotenoidi pari a $0,70 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ PF. In particolare, il genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato in condizioni di restituzione dell'acqua alla capacità di campo, ha mostrato un contenuto medio in carotenoidi di $0,70 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ PF, mentre la IL9-2-5 allevata nelle stesse condizioni ha mostrato un contenuto medio pari a $0,62 \pm 0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ PF (tab. 3.4). Per contro, nelle condizioni di allevamento che hanno previsto la restituzione della metà dell'acqua perduta (50%), il contenuto in carotenoidi del frutto maturo è risultato essere di $0,87 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ PF in M82 e di $0,62 \pm 0,00 \mu\text{g g}^{-1}$ PF nella IL9-2-5 (tab. 3.4).

La differenza tra i due genotipi al trattamento che ha previsto la restituzione del 50% dell'acqua perduta è risultata essere significativa al test t di Student ($P < 0,05$). Inoltre, il modello ANOVA per misure ripetute ha evidenziato che i due genotipi rispondono in maniera significativamente differente alla ridotta restituzione di acqua in termini di contenuto in fenoli totali.

Glutazione

I frutti rosso maturi raccolti da piante di M82 ed IL9-2-5 trattate con reintegrazione del 100% e del 50% dell'acqua perduta sono stati analizzati per contenuto in glutazione totale e glutazione ridotto mentre il glutazione ossidato, che è la forma più abbondante di glutazione che si ritrova nella cellula, è stato determinato per differenza tra il glutazione totale e quello ridotto.

Glutazione Totale:

Nel 2009 è stato rilevato un contenuto medio di glutazione totale in tutti i campioni saggiati pari a $5,06 \pm 0,08 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato restituendo acqua alla capacità di campo, è stato misurato un contenuto medio di glutazione totale di $5,02 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF, mentre nella IL9-2-5 allevata utilizzando il medesimo trattamento è stato ottenuto un valore medio pari a $4,92 \pm 0,14 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF (tab. 3.4). Per contro, in condizioni di ridotta restituzione di acqua (50%), è stata osservata una concentrazione media di glutazione totale pari a $5,24 \pm 0,10 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF nel parentale M82 e di $5,05 \pm 0,06 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF nella IL9-2-5 (tab. 3.4).

La differenza tra i due genotipi restituita nei due trattamenti di restituzione dell'acqua perduta (100% e 50%) non è risultata significativa al test t di Student ($P < 0,05$).

Glutazione Ridotta (GSH):

Nel 2009 è stato rilevato un contenuto medio di glutazione ridotto in tutti i campioni saggiati pari a $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato campo operando la la restituzione del 100% dell'acqua eprduta, è stato osservato un contenuto di glutazione totale di $0,04 \pm 0,00 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF, mentre nella IL9-2-5 allevata nelle stesse condizioni, tale contenuto è risultato pari a $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF (tab. 3.4). Invece, in condizioni di restituzione del 50% dell'acqua eprdutail parentale M82 ha evidenziato un contenuto in glutazione ridotto pari a $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF mentre tale contenuto è risultato pari a $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF nella IL9-2-5.

Le differenze osservate tra i due genotipi non sono risultate statisticamente significative. Nella sola linea M82 è stato osservato un incremento significativo del GSH al diminuire della restituzione di acqua perduta dal 100% al 50% al test t di Studnet ($P > 0.05$) mentre nella linea IL9-2-5 il contenuto in glutation ridotto non ha mostrato variazioni significative tra i due trattamenti idrici.

Glutazione Ossidato (GSSG):

Nel 2009 è stato rilevato in tutti i campioni saggiati un contenuto medio di glutazione ossidato pari a $5,01 \pm 0,08 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF. Nel genotipo parentale *S. lycopersicum* cv. M82, allevato restituendo acqua alla capacità di campo, è stato osservato un contenuto di glutazione totale di $4,98 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF, mentre nella IL9-2-5, allevata nelle stesse condizioni, è stata osservato un contenuto medio di glutazione ossidato pari a $4,87 \pm 0,14 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF (tab. 3.4). In condizioni di restituzione del 50% di acqua perduta, la linea parentale M82 ha mostrato un contenuto in glutazione ossidato pari a $5,19 \pm 0,10 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF mentre nella IL9-2-5 detto contenuto è risultato essere pari a $5,00 \pm 0,07 \mu\text{g mg}^{-1}$ PF (tab. 3.4). Le differenze tra trattamenti e tra genotipi nell'ambito di ciascun trattamento non sono risultate significative al test t di Student.

3.2 Caratterizzazione morfologica delle linee IL 9-2-5 ed M82 allevate a due differenti livelli di restituzione idrica

Nell'ambito del secondo esperimento che ha previsto allevamento nel corso del 2011 in condizioni semi-controllate dei genotipi M82 ed IL9-2-5 a differenti livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata, sono stati rilevati anche caratteri biometrici della parte epigea della pianta. In particolare, i caratteri rilevati sono stati rappresentati dalla biomassa verde, il numero e la lunghezza delle ramificazioni principali ed il numero di foglie per ciascuna ramificazione principale (tab. 3.6). L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i genotipi ed i trattamenti né alcuna significativa interazione *genotipo x trattamento*.

Tabella 3.6. Media ed errore standard di 4 caratteri biometrici rilevati sulla parte epigea di piante allevate in condizioni semi-controllate e a differenti trattamenti idrici.

	100%				50%			
	M82		IL9-2-5		M82		IL9-2-5	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Biomassa verde (g)	288,267	34,336	367,9	121,9	322,8	19,719	395,75	62,75
Ramificazioni principali (n°)	4,333	0,333	5,5	0,5	5	0,577	4	1
Lunghezza ramificazioni principali (cm)	36,308	2,011	39,7	2,236	39,267	1,364	43,375	3,859
Foglie (n°)	7,077	0,746	7,4	0,476	8,067	0,463	7,875	0,875

*: differenza statisticamente significativa rispetto ad M82 al test t di Student per $0.05 > P > 0.01$

3.3 Caratterizzazione morfologica comparativa dell'apparato radicale nelle linee IL9-2-5 ed M82

Osservazioni empiriche preliminari inducevano ad ipotizzare che la maggiore tolleranza della IL9-2-5 ad una ridotta disponibilità idrica potesse dipendere da differenze nella morfologia dell'apparato radicale (fig. 3.1). Per confutare o rifiutare tale ipotesi, sono stati disegnati e condotti esperimenti volti alla caratterizzazione morfologica comparativa dell'apparato radicale della IL9-2-5 e di M82.

Per giustificare la tolleranza alla siccità della IL9-2-5 si è indagato sulla morfologia e sull'architettura dell'apparato radicale rapportando questo dato a quello della produzione di biomassa verde.

Le radici delle piante dell'esperimento condotto a Portici nel 2011 sono state separate dalla parte aerea e lavate sotto acqua corrente per eliminare l'eccesso di particelle di suolo, avendo cura di non apportare lesioni (fig.3.1). Per ogni pianta è stato misurato il peso della biomassa verde e il numero di ramificazioni principali e secondarie e la loro lunghezza. In particolare, la IL 9-2-5 mostrava un peso della biomassa verde maggiore rispetto M82, sia cresciuta in condizioni normali che di stress idrico. In generale la media della produzione di biomassa verde è di 328,18 g. In condizioni normali, la M82 presentava una produzione media di 288,27 g e la IL9-2-5 di 489,80 g. In condizioni di moderato stress idrico (50% di acqua restituita), la M82 aveva una produzione di 322,80 g, inferiore a quella di IL9-2-5 che era pari a 395,75 g. In condizioni di irrigazione normale la M82 presentava una media di 4,33 ramificazioni principali mentre la IL9-2-5 ne presentava 6. In condizioni di moderato stress idrico (50% di acqua restituita), la M82 aveva una media di 5 ramificazioni principali e la IL9-2-5 ne aveva 4. La lunghezza media delle ramificazioni principali era di 39,21 mm. La M82 in condizioni di irrigazione normale aveva ramificazioni lunghe in media 31,33 mm, mentre nella IL9-2-5 misuravano 50,00 mm. In condizioni di moderato stress idrico (50% di acqua restituita), la M82 aveva ramificazioni principali lunghe in media 39 mm e la IL9-2-5 34,50 mm.

Siccome si sono notate importanti differenze a livello dell'architettura e sviluppo dell'apparato radicale, sono stati condotti diversi esperimenti al fine di individuare le differenze tra le due linee, andando ad indagare nei singoli ordini delle radici primarie ed avventizie.

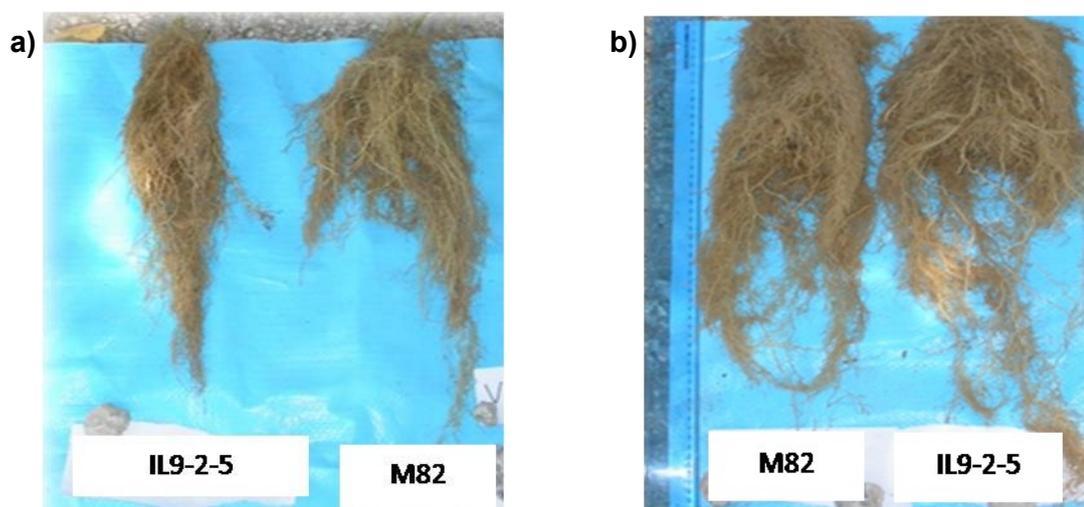


Figura 3.1. Foto delle radici della IL9-2-5 e della M82 estratte dalle prove con restituzione dell'acqua alla capacità di campo (a) e al 50% della capacità di campo (b).

I semi di IL9-2-5 ed M82 sono stati posti a germinare su carta 3M imbevuta d'acqua all'interno di capsule di Petri (fig. 3.2). Dopo 7 giorni le radici di IL9-2-5 hanno evidenziato uno sviluppo lineare significativamente superiore a quelle di M82 (tab. 3.7). L'esperimento è stato ripetuto nelle medesime condizioni ed analogamente è stato ottenuto uno sviluppo lineare della radice primaria superiore in IL9-2-5 rispetto ad M82 (tab. 3.7).



Figura 3.2. Semi germinati su carta 3M imbevuta di acqua, a 7 gg dalla germinazione

Tabella 3.7 - Sviluppo lineare della radichetta primaria a 7 giorni dalla semina su carta bibula

Esperimento	Genotipo	Sviluppo lineare (mm)	
		Media	Errore standard
I	M82	28,313	4,257
	IL9-2-5	60,632**	5,652
II	M82	51,101	7,510
	IL9-2-5	81,675*	3,762

*: differenza statisticamente significativa al test ANOVA per $0,01 < P < 0,05$

** : differenza statisticamente significativa al test ANOVA per $P < 0,01$

Un successivo esperimento è stato condotto facendo germinare i semi *in vitro* su un mezzo MS con un supplemento di 20 g l⁻¹ di saccarosio. Dopo 21 giorni non sono state rilevate differenze significative in termini di sviluppo radicale lineare e numero di radici tra IL9-2-5 ed M82 (tab. 3.8). A 40 gg dalla germinazione, invece, la IL9-2-5 ha mostrato uno sviluppo lineare totale dell'apparato radicale ed uno sviluppo lineare delle radici avventizie di primo ordine significativamente superiore rispetto alla linea M82 (fig. 3.3 e tab. 3.9).



Figura 3.3. Piante cresciute *in vitro* su mezzo MS con supplemento di saccarosio a 30 gg dalla germinazione

Tabella 3.8. Sviluppo lineare per tipologia di radice a 21 giorni dalla semina *in vitro*.

Tipologia radice	Genotipo	Sviluppo lineare (mm)		Numero	
		Media	Errore standard	Media	Errore standard
Radice Primaria	M82	44,924	6,910	4,33	0
	IL9-2-5	47,139	6,384	4,00	0
Radice Primaria II ordine	M82	61,621	27,111	1,00	0
	IL9-2-5	59,580	40,453	1,00	2,40
Radice avventizia I ordine	M82	86,185	31,286	4,33	1,00
	IL9-2-5	91,543	34,305	3,00	1,20
Totale	M82	192,731	53,232	8,00	1,00
	IL9-2-5	198,262	62,719	9,67	2,73

Le differenze rispetto ad M82 non sono significative al test ANOVA per $P < 0,05$.

Tabella 3.9. Sviluppo lineare per tipologia di radice a 40 giorni dalla semina *in vitro*.

Tipologia radice	Genotipo	Sviluppo lineare (mm)		Numero	
		Media	Errore standard	Media	Errore standard
Radice Primaria	M82	61,66	6,32	1,00	61,66
	IL9-2-5	75,83	4,17	1,00	0,00
Radice Primaria - II ordine	M82	113,32	7,92	6,33	0,67
	IL9-2-5	470,98	223,70	9,50	4,50
Radice avventizia - I ordine	M82	133,98	38,66	4,00	1,00
	IL9-2-5	333,52*	65,62	7,00	1,00
Radice avventizia - II ordine	M82	72,29	72,29	3,67	3,67
	IL9-2-5	252,81	252,81	4,00	4,00
Totale	M82	381,25	71,80	15,00	3,79
	IL9-2-5	1133,14**	98,90	21,50	1,50

*: differenza statisticamente significativa al test ANOVA per $0,01 < P < 0,05$

** : differenza statisticamente significativa al test ANOVA per $P < 0,01$

In un altro esperimento le piante sono state allevate in serra all'interno di vasi fino alla fioritura e le radici sono state quindi estratte per il rilevamento di alcuni caratteri biometrici (fig. 3.4). In particolare, la IL9-2-5 ha mostrato un numero di radici avventizie ed un rapporto biomassa verde/biomassa radicale significativamente superiori rispetto ad M82 (tab. 3.10).

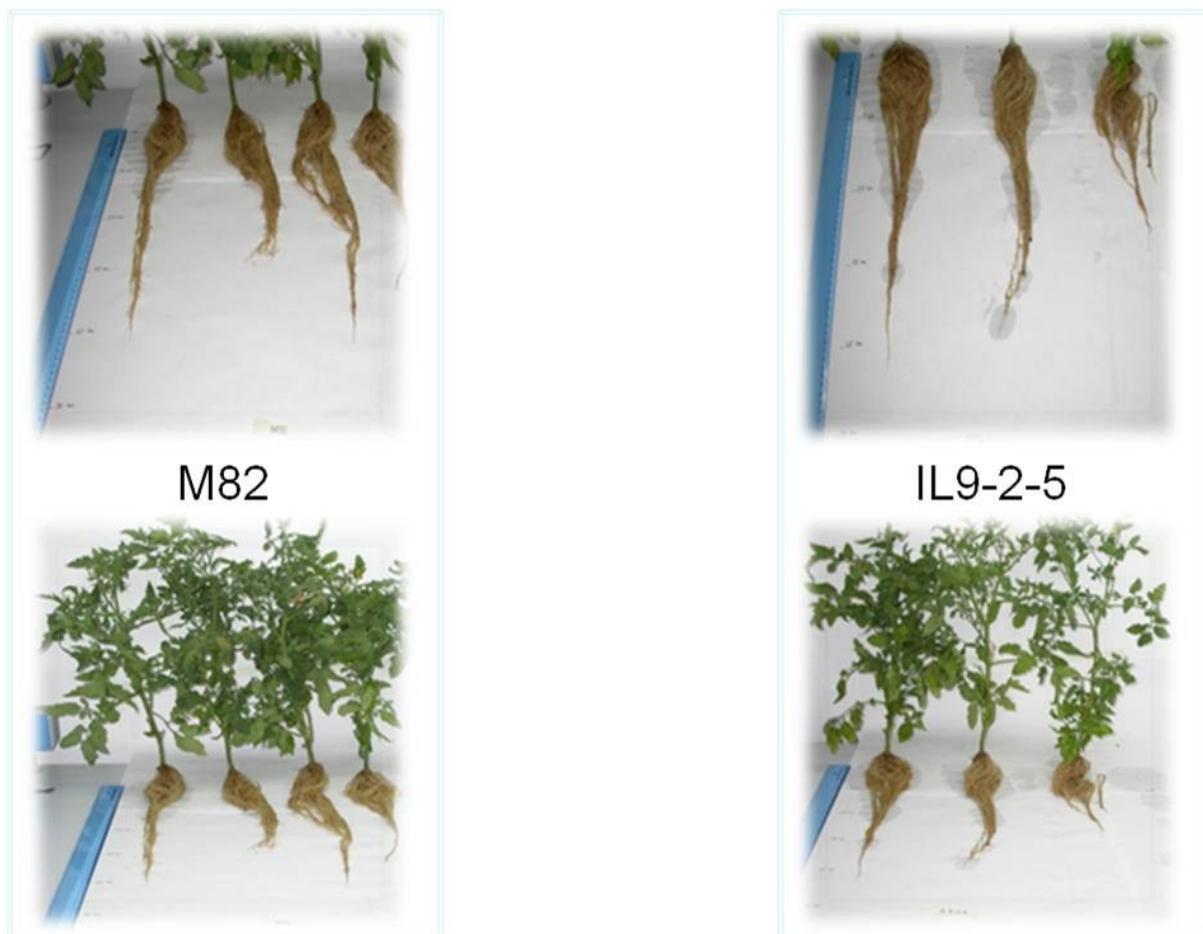


Figura 3.4. Piante allevate in vaso e in serra a 30 gg dal trapianto.

Tabella 3.10. Caratteri biometrici rilevati su piante allevate in serra rilevati a 30 gg dopo il trapianto in vaso.

Fenotipo	M82		IL9-2-5	
	Media	Errore standard	Media	Errore standard
Massima profondità della radice cm	45,60	7,74	41,50	2,50
Numero radici avventizie n°	19,60	2,42	37,00**	1,00
Massima profondità del fittone cm	23,59	4,03	18,40	0,20
Biomassa radici avventizie g	6,38	1,22	6,43	2,55
Biomassa radicale totale g	29,97	3,95	24,83	2,75
Biomassa verde g	81,31	3,91	88,18	9,87
Rapporto biomassa verde su biomassa radicale	2,85	0,26	3,55*	0,00

*: differenza statisticamente significativa al test t di Student per $0,01 < P < 0,05$

** : differenza statisticamente significativa al test test t di Student per $P < 0,01$

Infine, la IL9-2-5 ed il parentale coltivato M82 sono stati allevati per 40 giorni facendo sviluppare le radici su strati di carta 3M imbevuti con soluzione nutritiva per idroponica prima di essere utilizzate per il rilevamento di caratteri biometrici mediante tecniche di imaging (fig. 3.5). L'analisi ha evidenziato nella IL9-2-5 un maggiore sviluppo lineare delle radici primarie di I e II ordine, delle radici avventizie di I e II ordine, delle totale delle radici primarie e delle radici avventizie e del totale delle radici rispetto ad M82 (tab. 3.11). E' stato anche osservato un numero di radici avventizie di I ordine significativamente superiore nella IL9-2-5 rispetto ad M82.

La differenza è significativa al test T-student per $P < 0,01$. Andando ad osservare nel particolare le radici avventizie si sono osservate differenze significative nello sviluppo delle radici di I e II ordine. M82 presentava uno sviluppo lineare delle radici avventizie di I ordine pari a $510,709 \pm 56,029$ mm e la IL9-2-5 pari a $1557,701 \pm 424,665$ mm; anche la differenza numerica delle stesse era significativa, infatti, M82 aveva un numero di radici di I ordine pari a $5 \pm 0,577$ mentre la IL9-2-5 pari a 12 ± 2 . In entrambi i casi, le differenze erano significative al test T-student per $0,01 < P < 0,05$. M82, poi, presentava uno sviluppo lineare delle radici avventizie di II ordine pari a $128,333 \pm 38,224$ mm e la IL9-2-5 pari a $475,830 \pm 17,517$ mm. La differenza è significativa al test T-student per $P < 0,01$.

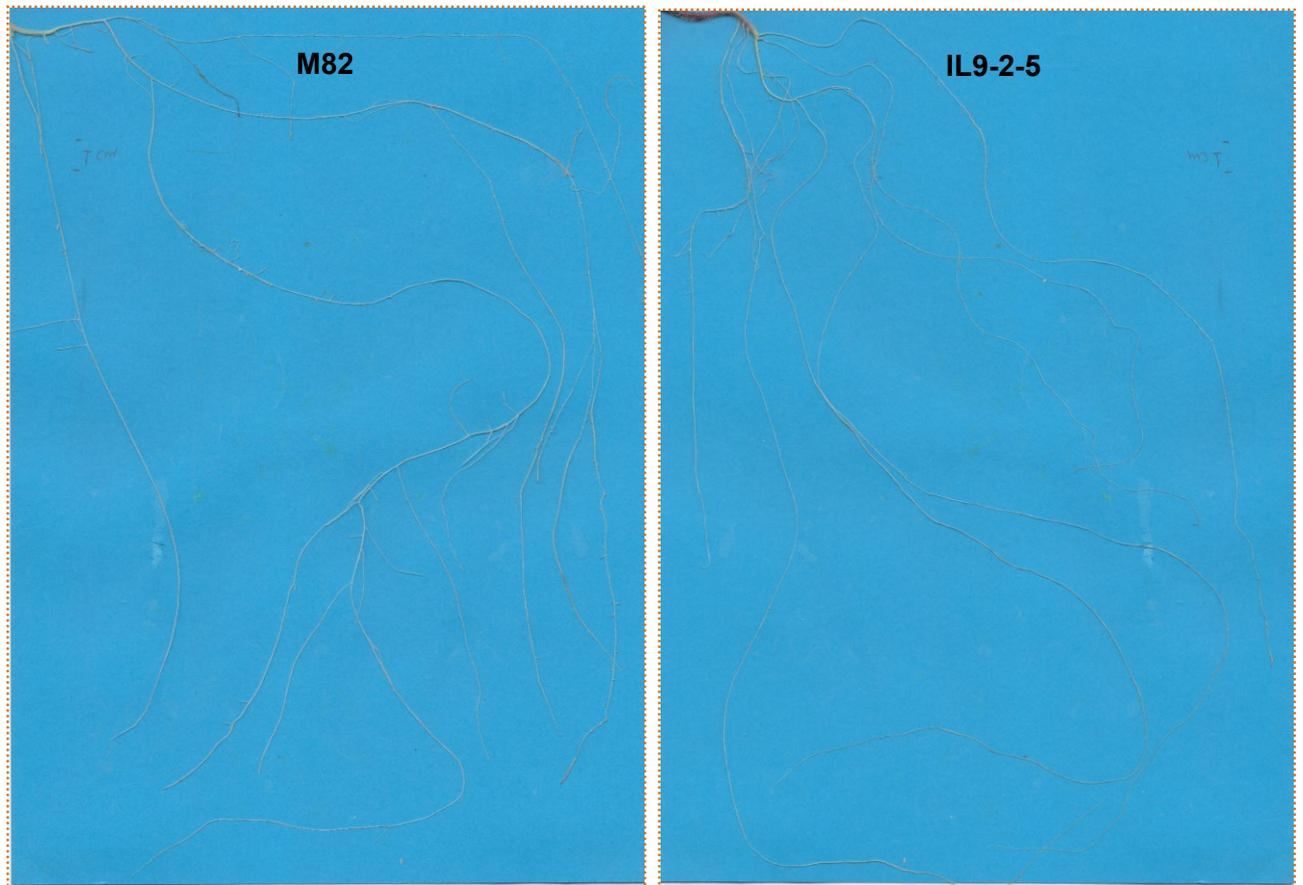


Figura 3.5. Radici di semi germinati su carta imbevuta da una soluzione idroponica.

Tabella 3.11. Numero e sviluppo lineare rilevati su radici di piante di 30 gg allevate su carta adsorbita con soluzione idroponica

Tipologia radice	Ordine	Genotipo	Sviluppo lineare (mm)		Numero radici	
			Media	Errore standard	Media	Errore standard
Primaria	I	M82	348,600	31,044	1,000	0
		IL9-2-5	610,021**	14,751	1,000	0
	II	M82	447,604	81,079	3,000	1,000
		IL9-2-5	1522,613*	307,709	12,667	7,688
	III	M82	247,636	103,509	8,400	3,932
		IL9-2-5	216,220	136,441	6,000	5,060
	IV	M82	0,000	0,000	0,000	0
		IL9-2-5	3,550	3,550	0,200	0,200
Avventizia	I	M82	510,709	56,029	5,000	0,577
		IL9-2-5	1557,701*	424,665	12,000*	2,000
	II	M82	128,333	38,224	3,333	2,333
		IL9-2-5	475,830**	17,517	16,000	9,000
	III	M82	4,369	4,369	0,600	0,600
		IL9-2-5	58,818	58,818	0,500	0,500
	IV	M82	0	0	0	0
		IL9-2-5	0	0	0	0
Totale primaria		M82	401,413	47,167	7,000	1,000
		IL9-2-5	1601,524**	98,982	19,000	12,000
Totale avventizie		M82	597,726	108,682	8,000	3,000
		IL9-2-5	2151,167**	324,546	29,000	10,000
Totale generale		M82	1485,565	257,468	26,333	14,345
		IL9-2-5	3062,571*	294,033	36,000	7,000

*: differenza statisticamente significativa al test t di Student per $0,01 < P < 0,05$ **: differenza statisticamente significativa al test test t di Student per $P < 0,01$

3.4 Analisi Microarray

L'elaborazione statistica dei dati trascrittomici mediante ANOVA a due fattori (genotipo e trattamento) ha consentito l'identificazione di 544 trascritti mostranti interazione significativa *genotipo x trattamento* (i 544 TC rappresentano circa 2,69% di tutti i trascritti presenti sul chip) (Appendice 1). Tra categoriale categorie di "Gene Ontology" maggiormente rappresentate si evidenziano "cellular macromolecule metabolic process" (13%), "protein metabolic process" (12%), "macromolecule biosynthetic process" (8%), "cellular biosynthetic process" (8%) e "transport" (7%) (fig. 3.6).

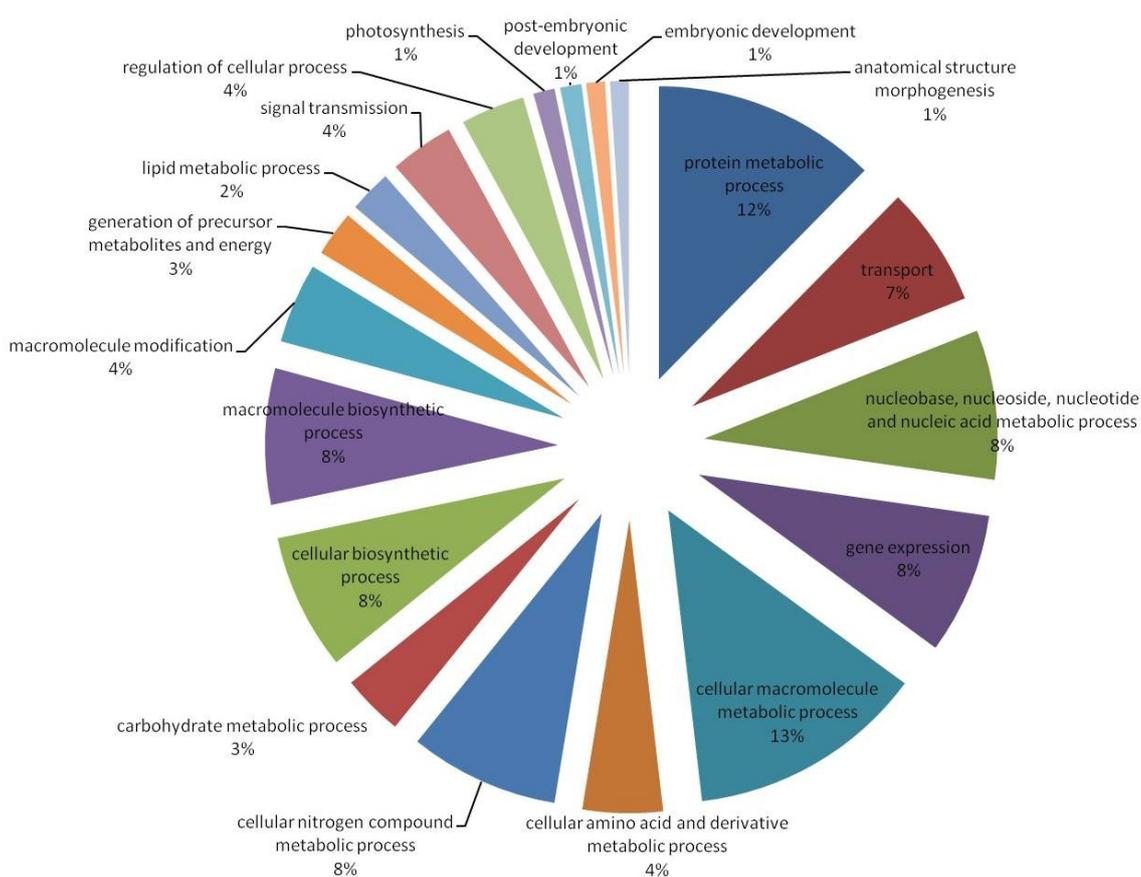


Figura 3.6. Categorizzazione per Gene Ontology dei trascritti mostranti interazione significativa genotipo x trattamento idrico.

Inoltre, i confronti a coppie mediante test T di Student hanno permesso di isolare gli effetti dei singoli fattori e di separare quindi i geni con espressione significativamente differente nei due trattamenti nel genotipo parentale M82 (M82

50% vs 100%, tab. 3.12) e nei due genotipi ad una ridotta restituzione di acqua (IL9-2-5 50% vs M82 50% tab. 3.13).

Tabella 3.12. Analisi comparativa dei risultati Microarray. Confronto dei trattamenti all'interno del genotipo controllo.

M82 50% vs M82 100%		
ID	Annotazione	Fold change
ID_09496	anthocyanidin synthase	-3,66
ID_01772	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3	-3,19
ID_02363	---NA---	-3,11
ID_09985	Protein	-3,03
ID_01765	ppgpp synthetase	-3,00
ID_07193	cdk5 activator-binding	-2,89
ID_06686	---NA---	-2,83
ID_08123	at5g25460 f18g18_200	-2,76
ID_04933	---NA---	-2,75
ID_05216	incorporation or reduction of molecular2-oxoglutarate	-2,67
ID_01279	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	-2,66
ID_01391	r2r3-myb transcription factor	-2,66
ID_04692	phosphoglycerate mutase	-2,59
ID_01554	---NA---	-2,50
ID_01096	receptor-like protein kinase	-2,48
ID_01279	2-oxoisovalerate dehydrogenase alphasubunit mitochondrial	-2,32
ID_06624	esterase d formylglutathione hydrolase	-2,30
ID_03161	retinoblastoma-related protein	-2,30
ID_03979	---NA---	-2,26
ID_05830	ribosomal protein l10a	-2,25
ID_04405	seven transmembrane protein mlo8	-2,24
ID_05708	---NA---	-2,22
ID_00235	photoassimilate-responsive protein par-1b-like protein	-2,17
ID_01507	pointed first leaf	-2,12
ID_02553	tpl wisp1 (wus-interacting protein 1)	-2,12
ID_01945	dehydration responsive element-binding protein 1	-2,11
ID_09197	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,10
ID_04026	bzip transcription factor protein	-2,09
ID_01649	importin alpha	-2,09
ID_03743	ump6_arathame: full=uncharacterized protein mitochondrial flags: precursor	-2,07
ID_03608	glutamate decarboxylase	-2,06
ID_01944	Protein	-2,06
ID_01007	---NA---	-2,05
ID_05199	mago nashi	-2,03
ID_04070	Chitinase	-2,01
ID_06773	acid phosphatase	-1,99
ID_08449	Protein	-1,94
ID_02444	cytochrome b561	-1,93
ID_09520	Protein	-1,92

ID_08475	7-dehydrocholesterol reductase	-1,92
ID_05281	---NA---	-1,92
ID_03723	rna-binding protein	-1,91
ID_06823	oligopeptidase a	-1,91
ID_00090	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	-1,91
ID_02459	skp1-like protein 1	-1,91
ID_00371	---NA---	-1,90
ID_05433	pollen ole e 1 allergen and extensin family	-1,90
ID_05349	vtc2-like protein	-1,89
ID_06569	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency - group 1	-1,88
ID_07530	nbs-lrr protein	-1,88
ID_07507	aspartyl protease family protein	-1,87
ID_09679	Fumarylacetoacetase	-1,86
ID_04701	---NA---	-1,85
ID_01656	chloroplast chlorophyll a b-binding protein	-1,84
ID_02133	40s ribosomal protein s16	-1,84
ID_08946	Protein	-1,82
ID_00392	---NA---	-1,81
ID_03401	---NA---	-1,80
ID_02419	40s ribosomal protein s12	-1,79
ID_02031	---NA---	-1,78
ID_00723	Cinnamoylreductase	-1,78
ID_00208	glycine rich	-1,75
ID_04001	harpin-induced hin1-related harpin-responsive	-1,73
ID_07339	---NA---	-1,72
ID_04358	gibberellin 2-oxidase	-1,70
ID_04433	40s ribosomal protein s4	-1,70
ID_03271	peptidylprolyl isomerase	-1,69
ID_02678	lipase-like protein	-1,69
ID_05829	---NA---	-1,68
ID_06407	transducin familyexpressed	-1,67
ID_06546	adp atp translocase-like protein	-1,67
ID_01060	salt tolerance protein	-1,66
ID_02326	at3g01470 f4p13_2	-1,66
ID_09944	fiber protein fb11	-1,66
ID_00884	bax inhibitor-1	-1,64
ID_00251	at3g22430 mcb17_17	-1,62
ID_02360	---NA---	-1,61
ID_01473	40s ribosomal protein s19	-1,60
ID_01009	s haplotype-specific f-box	-1,59
ID_08729	---NA---	-1,57
ID_01184	atgrip grip protein binding	-1,55
ID_09722	patatin-like protein	-1,55
ID_01038	3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	-1,52
ID_04355	nadh-ubiquinone oxidoreductasesubunit	-1,49
ID_05752	splicing factorsubunit66kda	-1,49
ID_05738	atnudt23 (arabidopsis thaliana nudix hydrolase homolog 23) hydrolase	-1,47
ID_00223	ring-h2 finger proteinexpressed	-1,45
ID_04915	threonyl-trna synthetase	-1,43
ID_05125	catalytic acting on nadh or nadph	-1,42
ID_01495	dna helicase-like	-1,42
ID_04513	arginyl-trna synthetase	-1,40
ID_02294	membrane receptor-like protein 1	-1,39
ID_00231	succinyl--ligase alpha subunit	-1,37

ID_02636	Protein	-1,35
ID_04610	beta-galactosidase	-1,34
ID_07049	udp-glucose dehydrogenase	-1,34
ID_06502	---NA---	-1,31
ID_07252	Protein	-1,30
ID_02103	acch1_arathame: full=1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1	-1,29
ID_00235	nod26-like major intrinsic protein	-1,27
ID_07090	enoyl-hydratase	-1,23
ID_08856	nucleosome chromatin assembly factor a	-1,22
ID_08274	glycine-rich protein	-1,22
ID_06690	40s ribosomal protein s9	-1,21
ID_05582	6-phosphogluconolactonase-like protein	-1,21
ID_04627	c-x8-c-x5-c-x3-h type zn-finger	-1,18
ID_01822	Cyclophilin	-1,17
ID_08216	bhlh transcription	-1,17
ID_00196	proline-rich cell wall	-1,17
ID_06998	cysteine synthase	-1,15
ID_05613	dnaj heat shock n-terminal domain-containing protein	-1,14
ID_02767	burp domain-containing protein	-1,13
ID_00612	---NA---	-1,13
ID_03466	cytidine deaminase	-1,12
ID_09797	aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-1,08
ID_04304	h+-transporting atpase-like protein	-1,08
ID_02306	universal stress proteinfamily protein	-1,08
ID_04983	nucleotide binding	-1,07
ID_09979	---NA---	-1,06
ID_04072	zinc finger transcription factor-like protein	-1,05
ID_05333	gaga-binding transcriptional activator	-1,05
ID_05001	---NA---	-1,02
ID_01444	shikimate kinase family protein	-1,01
ID_00632	vesicle-associated membranesynaptobrevin 7b	-0,97
ID_00763	---NA---	-0,97
ID_05681	---NA---	-0,96
ID_03873	Protein	-0,92
ID_07812	ssy2_soltuame	-0,92
ID_00191	s-domain receptor-like protein kinase	-0,91
ID_05288	dehydration-responsive family protein	-0,91
ID_00651	vacuolar protein sorting 55 family protein vps55 family protein	-0,87
ID_06381	---NA---	-0,86
ID_06979	---NA---	-0,76
ID_04550	emb1273 (embryo defective 1273)	-0,74
ID_07832	lsm6u6 small nuclear rna associated	-0,68
ID_06692	sf21-like protein	-0,67
ID_08059	---NA---	-0,60
ID_05764	calcium-dependent protein kinase	-0,59
ID_09256	---NA---	-0,55
ID_07038	syringolide-induced protein 14-1-1	-0,48
ID_08041	mgc80911 protein	0,55
ID_09922	map kinase	0,62
ID_09373	---NA---	0,81
ID_00307	alpha-xylosidase precursor	0,85
ID_09686	beta-galactosidase precursor	0,85
ID_08001	---NA---	0,89

ID_00932	Chromomethylase	0,89
ID_02574	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0,90
ID_02082	trypsin proteinase inhibitor precursor	0,94
ID_01855	thioredoxin-like atp binding protein	0,99
ID_00001	---NA---	1,02
ID_01939	tata-binding protein	1,03
ID_04598	af385737_1at4g20350 f9f13_6	1,04
ID_01056	at3g24160 muj8_16	1,05
ID_07391	upf0183 protein	1,06
ID_09495	auxin-responsive protein	1,13
ID_01968	---NA---	1,16
ID_09949	ml domain protein	1,16
ID_04619	nramp family metal transporter	1,17
ID_08032	---NA---	1,19
ID_03999	phenylalanine ammonia-lyase	1,20
ID_01102	arf8	1,21
ID_06446	tetratricopeptide repeat-containing protein	1,24
ID_05963	emb1923 (embryo defective 1923)	1,25
ID_06641	protein kinase family protein	1,25
ID_05002	Protein	1,25
ID_03303	mrp-like abc transporter	1,25
ID_03685	gds1-motif lipase hydrolase-like protein	1,26
ID_00372	Protein	1,29
ID_09675	Protein	1,31
ID_04672	glycine-rich rna-binding protein	1,33
ID_08647	---NA---	1,34
ID_03063	solute carrier family 30 (zinc transporter)member 9	1,35
ID_07697	---NA---	1,37
ID_06011	---NA---	1,37
ID_06337	---NA---	1,39
ID_09119	dna methyltransferase zmet4	1,44
ID_01771	c2 domain-containing protein	1,44
ID_00956	aspartic protease	1,47
ID_06452	---NA---	1,48
ID_09442	protein kinase	1,50
ID_00171	arginine-aspartate-rich rna binding protein	1,50
ID_03125	aspartyl protease family protein	1,51
ID_06129	---NA---	1,52
ID_05217	thioredoxin-like 4b	1,55
ID_07307	fringe-related protein	1,56
ID_04727	dna-binding related protein	1,58
ID_06943	at5g22100 at5g22100	1,59
ID_00119	chloroplast-like protein	1,61
ID_07821	---NA---	1,66
ID_08359	at4g30400 f17i23_260	1,69
ID_06118	calcium binding protein	1,78
ID_06587	---NA---	1,85
ID_04812	urophorphyrin iii methylase	1,86
ID_00135	Polygalacturonase	1,88
ID_08439	two-component response regulator-likeexpressed	1,89
ID_02816	glutamine amidotransferase cyclase	1,89
ID_08639	---NA---	1,95
ID_00062	phosphate transporter	1,98
ID_08829	protease inhibitor seed storage lipid transfer proteinfamily protein	2,00

ID_06493	agenet domain-containing protein bromo-adjacent homology	2,04
ID_02614	chitinase domain-containing protein 1	2,17
ID_06062	glycyl-trna synthetase	2,29
ID_04532	1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase	2,33

Tabella 3.13. Analisi comparativa dei risultati Microarray. Confronto tra i genotipi in condizioni di stress moderato.

IL9-2-5 50% vs M82 50%

ID	Annotazione	Fold change
ID_06493	agenet domain-containing protein bromo-adjacent homologydomain	-2,40
ID_06452	---NA---	-2,23
ID_06062	glycyl-trna synthetase	-2,19
ID_00052	---NA---	-2,04
ID_03521	purple acid phosphatase	-2,00
ID_01280	lem3 (ligand-effect modulator 3) family protein cdc50 family protein	-1,91
ID_06748	---NA---	-1,91
ID_08032	---NA---	-1,70
ID_07223	tpa_exp:phytosulfokine peptide precursor	-1,66
ID_09144	soul heme-binding protein	-1,61
ID_02102	---NA---	-1,59
ID_00484	nadh-ubiquinone oxireductase	-1,55
ID_06965	map kinase kinase	-1,55
ID_00956	aspartic protease	-1,54
ID_04255	atp-dependent helicase	-1,51
ID_09478	p-p-bond-hydrolysis-driven protein transmembrane transporter	-1,50
ID_05217	thioredoxin-like 4b	-1,47
ID_08566	cullin 3b	-1,39
ID_06727	heat shock-like protein	-1,32
ID_00055	---NA---	-1,28
ID_06687	---NA---	-1,24
ID_07910	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	-1,07
ID_03359	---NA---	-0,95
ID_09050	had-superfamilysubfamilyvariant 3 containingexpressed	-0,36
ID_01796	membrane trafficking factor	0,33
ID_05116	nadh dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 5	0,69
ID_08605	neurogenic locus notch protein precursor-like	0,81
ID_02986	cleavage and polyadenylation specific factor160kda	0,82
ID_01444	shikimate kinase family protein	0,83
ID_02253	14-3-3 protein	1,00
ID_06297	Protein	1,03
ID_05681	---NA---	1,09
ID_09734	---NA---	1,15
ID_04398	cyclin dependent kinase inhibitor	1,21
ID_03163	histone h2b	1,21
ID_05626	adp-ribosylation factor	1,22
ID_09411	wd repeat domain 46	1,24

ID_02923	lactoylglutathione lyase family protein glyoxalase i family protein	1,28
ID_00240	voltage-dependent anion channel	1,30
ID_00884	bax inhibitor-1	1,30
ID_05199	mago nashi	1,36
ID_00360	photoperiod responsive protein	1,41
ID_09651	---NA---	1,55
ID_02987	af218765_1 177 protein	1,62
ID_05290	protein disulfide isomerase	1,65
ID_00121	---NA---	1,66
ID_02588	delta 9 desaturase	1,67
ID_07394	40s ribosomal protein s4	1,70
ID_01096	receptor-like protein kinase	1,74
ID_03271	peptidylprolyl isomerase	1,76
ID_01507	pointed first leaf	1,82
ID_07194	ubiquitin-conjugating enzyme	1,84
ID_01986	Protein	1,95
ID_05433	pollen ole e 1 allergen and extensin family	2,09
ID_00085	histone h2a	2,10
ID_04072	zinc finger transcription factor-like protein	2,18
ID_00235	photoassimilate-responsive protein par-1b-like protein	2,32
ID_04405	seven transmembrane protein mlo8	2,36
ID_04933	---NA---	2,36
ID_06686	---NA---	2,58
ID_02265	atp phosphoribosyl transferase	2,65
ID_00995	---NA---	3,49

M82 50% vs 100%

204 sonde hanno mostrato un differente segnale di espressione tra in M82 quando sottoposto ai due differenti trattamenti idrici. Di queste 64 hanno mostrato sovra-espresse e 140 sotto-espressione. Dei geni differenzialmente espressi, un sottogruppo di geni potenzialmente coinvolti, secondo le conoscenze disponibili, nel determinare le variazioni osservate in termini di qualità del frutto sono stati classificati in categorie come di seguito riportato:

- 1) geni putativamente coinvolti nella sintesi di AsA:

ID	Annotazione	Fold Change
ID_04692	phosphoglycerate mutase	-2,59
ID_09197	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-2,10
ID_05349	vtc2-like protein	-1,89
ID_00231	succinyl--ligase alpha subunit	-1,37
ID_07049	udp-glucose dehydrogenase	-1,34
ID_00235	photoassimilate-responsive protein par-1b-like protein	-1,27

2) geni putativamente coinvolti in meccanismi di difesa:

ID	Annotazione	Fold Change
ID_04405	seven transmembrane protein mlo8	-2,24
ID_04070	Chitinase	-2,01
ID_01060	salt tolerance protein	-1,66

- in particolare difesa da stress idrico:

ID	Annotazione	Fold Change
ID_00884	bax inhibitor-1	-1,64
ID_02767	burp domain-containing protein	-1,13
ID_02306	universal stress proteinfamily protein	-1,08
ID_00956	aspartic protease	1,47
ID_08439	two-component response regulator-like expressed	1,89

3) geni putativamente coinvolti nella sintesi di fenoli

ID	Annotazione	Fold Change
ID_03999	phenylalanine ammonia-lyase	1,20

4) geni putativamente coinvolti nella sintesi di prolina

ID	Annotazione	Fold Change
ID_01772	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 3	-3,19
ID_03271	peptidylprolyl isomerase	-1,69
ID_01822	Cyclophilin	-1,17

5) geni che regolano i processi di replicazione, trascrizione e traduzione.

ID	Annotazione	Fold Change
ID_05199	mago nashi	-2,03
ID_04072	zinc finger transcription factor-like protein	-1,05
ID_01939	tata-binding protein	1,03

IL9-2-5 50% vs M82 50%

Il confronto trascrittomico tra i due genotipi ad una ridotta restituzione di acqua perduta ha mostrato variazioni significative nel segnale di espressione di 68 sonde di cui 38 hanno evidenziato sovra-espressione e 24 sotto-espressione. Dei geni differenzialmente espressi, un sottogruppo di geni che giustificano presumibilmente le variazioni osservate in termini di qualità del frutto sono stati classificati in categorie e qui di seguito riportati:

1) geni putativamente coinvolti nella risposta all'attività fotosintetica:

ID	Annotazione	Fold Change
ID_01444	shikimate kinase family protein	0,83
ID_00235	photoassimilate-responsive protein par-1b-like protein	2,32

2) geni putativamente coinvolti in meccanismi di difesa a differenti tipi stress:

ID	Annotazione	Fold Change
ID_08566	cullin 3b	-1,39
ID_06727	heat shock-like protein	-1,32
ID_07910	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	-1,07
ID_02923	lactoylglutathione lyase family protein glyoxalase I family protein	1,28
ID_00884	bax inhibitor-1	1,30
ID_02588	delta 9 desaturase	1,67

- gene coinvolto nello stress idrico : ID_00956 “aspartic protease” (fold change -1,54);

3) geni che regolano i meccanismi di regolazione della replicazione, trascrizione e traduzione del DNA.

ID	Annotazione	Fold Change
ID_03163	histone h2b	1,21
ID_05199	mago nashi	1,36
ID_02987	af218765_1 177 protein similar to At4g18610	1,62
ID_00085	histone h2a	2,10
ID_04405	seven transmembrane protein mlo8	2,36

3.5 Geni validati mediante qRT-PCR

L'analisi microarray non ha restituito segnali di espressione differenziale di geni coinvolti nel ciclo Halliwell-Asada il cui impatto sul livello di AsA soprattutto in risposta a situazioni di stress è stato sottolineato attraverso una cospicua produzione scientifica (Foyer, 1993). Tuttavia, molti di tali geni sono sfuggiti all'analisi perché eliminati nel corso della filtrazione dei dati in quanto posizionati sulle code di distribuzione e per tale ragione la loro espressione è stata saggiata mediante Real Time qPCR. In particolare, è stata analizzata l'espressione di 4

Monodeidroascorbato Reduttasi e 4 Deidroascorbato Reduttasi. L'analisi ha evidenziato la sovra espressione di due Monodeidroascorbato Reduttasi nei frutti di M82 allevati con una restituzione del 50% dell'acqua perduta rispetto ad M82 a cui è stata restituita il 100% dell'acqua perduta ed una sottoespressione di tre Monodeidroascorbato Reduttasi e tre Deidroascorbato Reduttasi nel frutto di IL9-2-5 rispetto ad M82 quando entrambi allevati con il trattamento 50%.

Inoltre, l'analisi Real Time RT-qPCR è stata anche utilizzata per validare i risultati dell'analisi Microarray. A tal proposito, otto geni sono stati scelti tra quelli considerati chiave nel modulare la qualità del frutto in risposta alla disponibilità idrica sono stati analizzati mediante Real Time RT-qPCR evidenziando una correlazione di Pearson del 78% ($R^2 = 0.89$) tra dati di espressione risultanti dall'analisi microarray e corrispondenti dati di espressione ottenuti mediante Real Time RT-qPCR. In particolare, l'analisi Real Time RT-qPCR ha confermato in M82 una significativa riduzione di abbondanza relativa del trascritto di una ABA 8'-hydroxylase CYP707A1 (ID_07455), di una cell-wall invertase (LIN5; ID_00476) e di una UDP-glucose 6-dehydrogenase (ID_07570) ed un significativo incremento dell'abbondanza relativa del trascritto di una Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase (ID_03191), di una Polygalacturonase (ID_07204) e di una er degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1 (ID_01351) ad un ridotto livello di restituzione di acqua. Per contro, l'approccio ha confermato nella IL9-2-5 una significativa riduzione, rispetto ad M82 ed in condizioni di ridotta restituzione dell'acqua, dell'espressione di una GDP-mannose pyrophosphorylase (ID_06959), di una Polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase (ID_03191), di una Polygalacturonase (ID_07204) e di una sequenza annotata come er degradation-enhancing alpha-mannosidase-like 1 (ID_01351), mentre è stata confermata un incremento significativo dell'espressione di una ABA 8'-hydroxylase CYP707A1 (ID_07455).

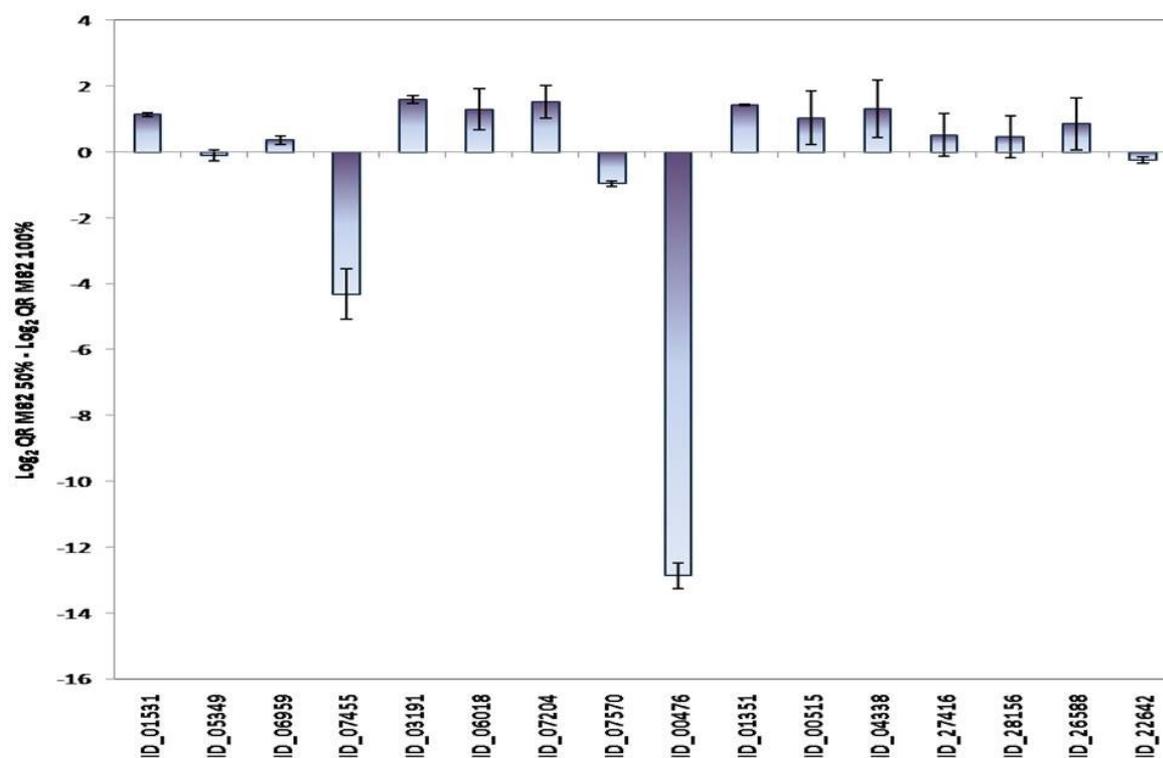


Figura 3.7. Livelli di espressione genica dei geni analizzati per qRT-PCR -espressi come Log_2 della Quantità Relativa (QR) nei due trattamenti a cui è stato sottoposto il genotipo parentale M82.

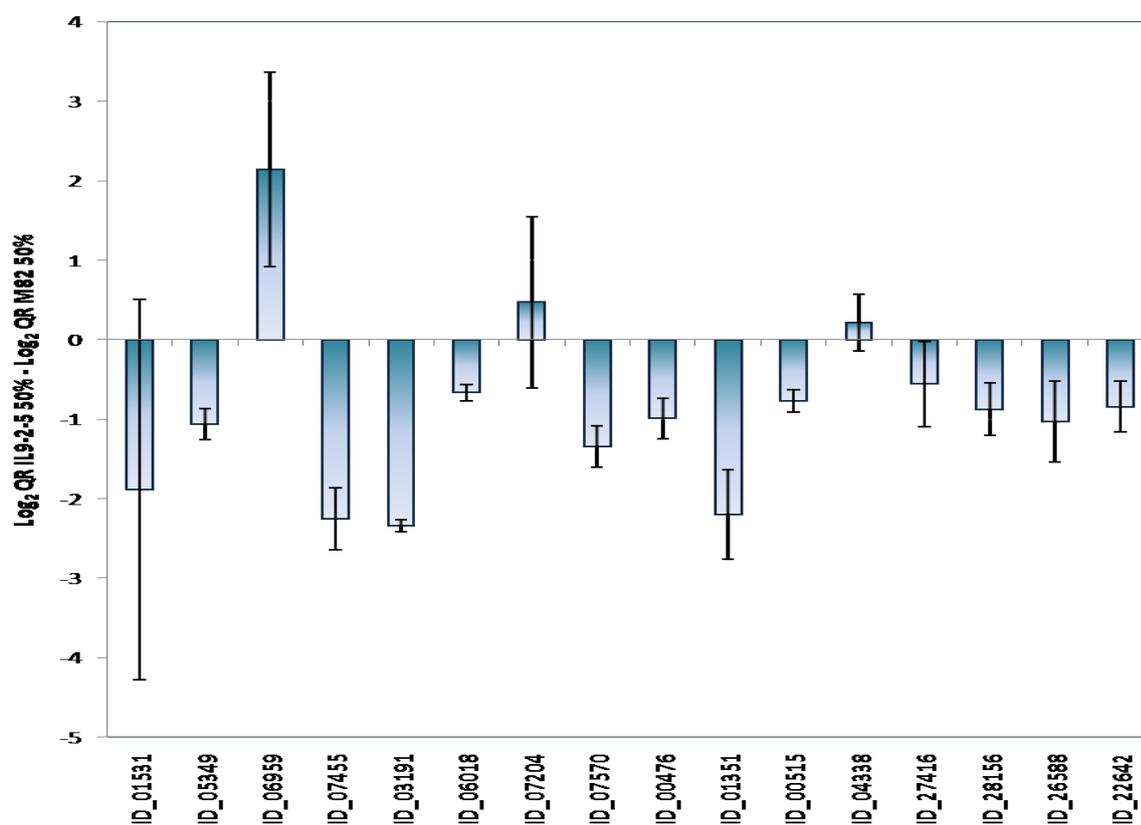


Figura 3.8. Livelli di espressione genica dei geni analizzati per qRT-PCR -espressi come Log_2 della Quantità Relativa (QR) nei due genotipi sottoposti ad una ridotta restituzione d'acqua (50%).

4. Discussioni

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) rappresenta una delle colture ortive più importanti al mondo, che, a seconda della destinazione commerciale, viene utilizzato sia come prodotto fresco che come prodotto trasformato per la produzione di pelati, concentrati e succhi. E' una delle tre colture più importanti al mondo, con una produzione di 126 milioni di tonnellate nel 2007. (FAOSTAT - <http://faostat.fao.org/>). Negli ultimi anni, la sua produzione globale è aumentata di circa il 10% con un contributo notevole alla dieta umana di molti paesi dove rappresenta la principale fonte di antiossidanti, vitamine e minerali (Frusciante *et al.*, 2007). L'interesse nel costituire varietà con resa, taglia, forma e proprietà organolettiche migliorate è stato da sempre l'obiettivo dei tradizionali programmi di breeding nel pomodoro (Frary *et al.*, 2003; van der Knaap *et al.*, 2004; Chaib *et al.*, 2006). In Europa il miglioramento genetico del pomodoro è iniziato più di 200 anni fa, avendo obiettivi diversi in accordo alle diverse tipologie del prodotto (da mensa o da industria) ed ai diversi sistemi di coltivazione. In particolare, negli ultimi anni l'attenzione dei breeder è stata rivolta al miglioramento delle caratteristiche organolettiche e della qualità nutrizionale del pomodoro. Infatti, i progressi della biologia molecolare e lo sviluppo di più efficienti strumenti d'ingegneria metabolica (Rosati *et al.*, 2000) hanno promosso studi in grado di migliorare le conoscenze in pomodoro dei pathway metabolici coinvolti nella sintesi di molecole ad attività antiossidante e di altri composti benefici per la salute. Indipendentemente da questi obiettivi, il miglioramento genetico del pomodoro ha prodotto eccellenti risultati dati gli sforzi fatti sia dalle istituzioni pubbliche che dalle compagnie private al fine di ottenere varietà migliorate in grado di soddisfare i bisogni dei coltivatori, degli industriali e dei consumatori. Tali successi sono dovuti anche ai nuovi approcci di genomica che hanno avuto un forte impatto sul miglioramento genetico del pomodoro, soprattutto per caratteri complessi. Tuttavia, la produttività delle piante può essere ampiamente compromessa da avversità sia di origine ambientale che biotica. Attualmente, visti i cambiamenti climatici globali che interessano il nostro pianeta, è necessario spostare l'attenzione verso nuovi caratteri d'interesse per il miglioramento genetico del pomodoro; tra questi, lo studio delle basi genetiche dell'adattamento alle avversità ambientali sta riscuotendo sempre maggiore interesse da parte della comunità scientifica. Infatti, nel prossimo futuro sono previste una diminuzione delle riserve di cibo disponibile, un aumento delle temperature e una minore disponibilità di risorse idriche. A questo

proposito le scienze biologiche e agronomiche stanno cercando di individuare soluzioni al fine di mantenere un'elevata efficienza di produzione delle colture in generale e del pomodoro in particolare. In particolare, si prevede che nei prossimi due decenni, a causa di una maggiore crescita della popolazione mondiale e dello sviluppo economico, il fabbisogno di risorse idriche possa raddoppiare. A livello mondiale, l'agricoltura è la principale attività coinvolta nello sfruttamento delle risorse idriche. Infatti, ogni anno circa il 70% di tutte le acque prelevate da fiumi, laghi e falde acquifere viene usato per irrigare il 17% della superficie coltivata mondiale. Tale superficie irrigata produce circa il 40% del fabbisogno alimentare mondiale. Inoltre, la scarsità d'acqua potrebbe diventare ancora più acuta in alcune zone a causa del cambiamento climatico globale (Minorsky, 2003).

A ciò si aggiunga che le piante, sia in sistemi naturali che in quelli agricoli, sono spesso sottoposte a stress abiotici come le temperature estreme, la scarsa disponibilità di acqua, l'elevata salinità, la carenza di minerali e la presenza di sostanze tossiche nel suolo. Si stima che nei diversi sistemi di coltivazione in tutto il mondo, gli stress abiotici sono in grado di ridurre la produzione di oltre la metà rispetto a quella possibile in condizioni di crescita ideali. Tra i vari stress abiotici, la siccità e le alte temperature sono i due principali fattori ambientali che influenzano la produttività delle piante e la loro distribuzione sul territorio. La siccità colpisce più del 10% dei terreni coltivati e su scala mondiale la desertificazione e la salinizzazione sono in rapido aumento, determinando un calo medio dei rendimenti di oltre il 50% per le principali specie coltivate (Bray *et al.*, 2000). Comprendere i meccanismi di tolleranza delle piante alla siccità e alle alte temperature è di fondamentale importanza per aiutare gli specialisti a sviluppare strategie volte a ottenere colture in grado di adattarsi alle avversità ambientali.

Attualmente, non sono disponibili tecnologie economicamente sostenibili per facilitare la produzione di colture in ambienti aridi. Tuttavia, lo sviluppo di piante tolleranti alla siccità potrebbe essere un approccio promettente che aiuti a soddisfare le esigenze alimentari. Lo sviluppo di colture con una maggiore tolleranza alla siccità, tra l'altro, richiede la conoscenza dei meccanismi fisiologici e genetici che contribuiscono al controllo delle caratteristiche delle piante a diversi stadi di sviluppo. Le piante possono percepire gli stress abiotici e reagire alterando il loro metabolismo, la loro crescita e il loro sviluppo. Esse hanno sviluppato diverse

strategie per far fronte a queste sfide mediante meccanismi di adattamento che consentano loro di sopravvivere alle condizioni avverse o sfuggendo alle condizioni di stress modificando il loro habitus di crescita. Le piante tolleranti allo stress hanno sviluppato diversi meccanismi adattativi che corrispondono a diversi gradi di tolleranza, in gran parte determinati dalla loro plasticità genetica. Diversi livelli di tolleranza potrebbero essere attribuiti a differenze nella reattività delle piante in termini di percezione dello stress, trasduzione del segnale ed espressione di specifici geni, o ad altri nuovi percorsi metabolici che sono limitati alle piante tolleranti.

Inoltre, questi specifici geni e diversi percorsi metabolici potrebbero essere presenti anche in piante non tolleranti poiché l'acclimatazione graduale di piante sensibili conduce, in una certa misura, all'acquisizione di tolleranza (Zhu, 2001).

Negli ultimi anni, sempre maggiore è stato l'interesse verso la costituzione di varietà con migliorate qualità dei frutti. Nell'ambito dei parametri che definiscono la qualità organolettica, la consistenza è una delle principali componenti della struttura di un frutto (tesi di dottorato della Dott.ssa A. Sacco). L'importanza di questo carattere è notevole dato che una maggiore consistenza è associata ad un incremento della resistenza del frutto fresco alla raccolta meccanizzata e al trasporto senza danni pregiudizievoli per la vendita e ad un incremento della shelf-life. Pochi studi hanno descritto la struttura del frutto nel suo insieme (Seymuor *et al.*, 2002). Molti studi, invece, hanno focalizzato l'attenzione sui singoli aspetti della struttura del frutto (Liebhard *et al.*, 2003), e più nello specifico, sulle proprietà della parete cellulare (Waldron *et al.*, 2003; Devaux *et al.*, 2005; Brummell, 2006). In effetti, un peggioramento nella consistenza tipicamente coincide con lo scioglimento della lamella, la depolimerizzazione e solubilizzazione delle emicellulose e delle pectine dei polisaccaridi della parete cellulare e, in alcuni casi, con il gonfiore della parete (Brummell & Harpster, 2001).

Tra i solidi solubili i principali zuccheri trovati nel frutto di pomodoro sono il saccarosio, il glucosio e il fruttosio con un alto accumulo di esoso, caratteristico per i pomodori coltivati (*S. lycopersicum*). Con l'acido quinic e citrico, questi composti sono i principali componenti della qualità per i pomodori da industria, determinando il contenuto di solidi solubili o indice di °brix (Carrari & Fernie 2006). Ad ogni modo, il contenuto in solidi solubili rappresenta un carattere di grande rilevanza nella

definizione della qualità della produzione dato l'elevata correlazione con la resa alla trasformazione.

Anche la qualità nutrizionale del frutto di pomodoro è un aspetto di grande interesse per il miglioramento genetico visto anche i risultati degli ultimi studi che hanno messo in luce l'importanza nutrizionale del licopene, dei flavonoidi e dell'acido clorogenico nella dieta umana (Davuluri *et al.*, 2005; Dixon, 2005; Niggeweg *et al.*, 2006; Rein *et al.*, 2006). La qualità nutrizionale del frutto di pomodoro è principalmente attribuita a molecole con attività antiossidante, molte delle quali giocano un ruolo importante nella difesa della pianta dallo stress e dal conseguente accumulo di ROS. Per ridurre il danno da accumulo di ROS, le cellule producono antiossidanti come carotenoidi e flavonoidi che eliminano i ROS (Smirnoff *et al.* 1993; Doraiss *et al.* 2008; Smirnoff *et al.* 1993; Kotikova *et al.* 2011).

Il pomodoro rappresenta una importante fonte di antiossidanti per l'uomo. Tra questi, l'apporto di AsA nella dieta umana riceve un significativo contributo dal pomodoro grazie all'alto consumo procapite nel mondo e agli alti livelli di accumulo di AsA nel frutto (approssimativamente 4 mg/100 PF) (Willcox *et al.*, 2003). Sebbene l'AsA sia sintetizzato dalle piante e da diversi animali, la specie umana non è in grado di sintetizzarlo a causa dell'inattività dell'enzima che catalizza l'ultimo passaggio della biosintesi ovvero l' L-gulonolo-1,4-lattone ossidoreduttasi. Pertanto, nell'uomo la vitamina C deve essere assunta attraverso la dieta (Zou *et al.*, 2006) posto che essa è coinvolta nella prevenzione dalle malattie cardiovascolari, nel potenziamento del sistema immunitario e nello sviluppo dei tessuti connettivi.

Il pomodoro rappresenta un'importante fonte di composti fenolici, come flavonoidi e acidi idrossicinnamici e ci sono evidenze di un loro effetto benefico sulla salute umana (Duthie & Crozier, 2000; Pietta, 2000; Nijveldt *et al.*, 2001). Inoltre la distribuzione dei composti fenolici in pomodoro varia ampiamente tra le varie parti della pianta, all'interno degli organi, tra i vari tessuti e a livello cellulare (Scalbert & Williamson, 2000). In generale i composti fenolici sono maggiormente concentrati negli organi aerei e nei tessuti epidermici di foglie e frutti. Anche fattori colturali ed ambientali possono influenzare la concentrazione fenolica, come mostrato da Raffo e collaboratori (2006) che riportano una variazione nei livelli dei fenoli associata alle condizioni ambientali.

Infine, il frutto del pomodoro contiene vari composti che sono potenzialmente benefici alla salute umana e che ricadono nella categoria dei carotenoidi. I livelli di tali composti variano a seconda della coltivazione, dello stadio di maturazione, delle condizioni di crescita e delle condizioni di stress ambientale (Doraiss *et al.* 2008; Slimstad *et al.* 2009). Il livello di carotenoidi è riportato aumentare con lo stress idrico e salino (Pernice *et al.* 2010; Zushi *et al.* 1998).

Molti miglioramenti in tal senso sono altamente desiderati considerando che molto spesso nel pomodoro la variabilità associata alle componenti nutrizionali ed organolettiche è stata erosa attraverso la diffusione su larga scala delle varietà migliorate (Goff & Klee, 2006; Morris & Sands, 2006). Tuttavia, combinare una maggiore tolleranza allo stress idrico con caratteristiche di superiore qualità nutrizionale ed organolettica potrebbe aumentare enormemente il valore aggiunto del pomodoro garantendo una migliore qualità delle produzioni ed una maggiore stabilità nell'espressione di tali caratteri, affrancando tale espressione dalla variabilità stagionale delle precipitazioni ed aumentando la sostenibilità economica ed ambientale dei sistemi produttivi del pomodoro. Infatti, studi differenti riportano la natura quantitativa della tolleranza alla ridotta disponibilità di acqua e dei caratteri della qualità nutrizionale ed organolettica del frutto. Tali caratteri sono controllati da molti geni ed hanno una variabilità continua fortemente influenzata dalle condizioni ambientali. In effetti, trovare la localizzazione genetica dei QTL è solo il primo passo verso la selezione di genotipi superiori. Infatti, lo studio approfondito delle basi molecolari e fisiologiche della tolleranza agli stress consentirebbe una più efficace utilizzazione della variabilità genetica per il potenziamento dell'adattabilità della pianta alle diverse condizioni ambientali (Snape *et al.*, 2007).

Un approccio potenzialmente utile e funzionale alla reintroduzione di variabilità genetica per i caratteri di interesse dalle specie selvatiche di pomodoro consiste nell'uso delle linee di introgressione (IL) in cui la variabilità degli alleli selvatici è reintrodotta nella varietà coltivata attraverso la sostituzione di singoli segmenti cromosomici mediante selezione assistita da marcatori molecolari (Zamir, 2001; Giovannoni, 2006).

Le IL sono particolarmente adatte a dissezionare caratteri complessi (QTL) come la tolleranza alla carenza idrica e la qualità del frutto, dato che le variazioni fenotipiche osservate possono essere direttamente associate al segmento

introgresso nella singola IL. Inoltre considerando la stabilità genetica di dette linee, gli esperimenti possono essere riprodotti facilmente anche da gruppi di ricerca indipendenti in aree geografiche e climatiche differenti. Il mappaggio dei QTL è diventato molto popolare negli studi di genetica di base e nel breeding del pomodoro, dove i QTL vengono identificati per numerosi caratteri complessi agronomicamente e biologicamente importanti. Molte specie selvatiche di pomodoro sono state usate per l'ottenimento di popolazioni di introgressioni utili per l'identificazione ed il mappaggio di geni e/o QTL. Tra tutte le popolazioni di introgressione, le IL di *S. pennellii* sono state molto utilizzate per lo studio delle basi ereditarie di caratteri complessi agronomicamente rilevanti (Eshed & Zamir, 1995; Eshed *et al.*, 1996). La popolazione delle IL di *S. pennellii* è stata già utilizzata per mappare i geni ed i QTL candidati per i carotenoidi e il colore dei frutti (Liu *et al.*, 2003), per il peso dei frutti e la composizione in zuccheri ed acidi organici (Causse *et al.*, 2004), per i composti antiossidanti (Rousseaux *et al.*, 2005), per l'acido ascorbico (Di Matteo *et al.*, 2010) ed altri metaboliti (Schauer *et al.*, 2006). Questi studi hanno sottolineato l'importanza di mettere in relazione dati ottenuti da prove replicate nel tempo e nello spazio per confermare la stabilità dei QTL identificati e quindi il ruolo della variabilità ambientale nell'espressione dei caratteri complessi.

Nelle specie di pomodoro coltivato esistono variazioni genetiche sostanziali per la tolleranza alla siccità (Wudiri & Henderson 1985), come anche nelle specie parentali selvatiche relative: *Solanum pennellii* (Corr.) D'Arcy, *Solanum chilense* Dun., *Solanum cheesmanii* Riley, *Solanum pimpinellifolium* (Just.) Mill., e *Solanum esculentum* var. *cerasiforme* (Dun.) Gray (Martin *et al.* 1989; Pillay & Beyl 1990; Richards & Phills 1979; Rick 1973, 1979, 1982; Yu 1972). Tuttavia, pochi lavori sono stati dedicati alla caratterizzazione fisiologica e/o genetica di queste variazioni nel pomodoro (Kahn *et al.* 1993; Martin *et al.* 1999) al fine di giustificare il suo uso per lo sviluppo di cultivar tolleranti la siccità. Tutto ciò è in contrasto alla consistente mole di lavori prodotti sulla tolleranza alla siccità di altre specie, come il riso (*Oryza sativa* L.) (Nguyen *et al.* 1997; Zhang *et al.* 2001), il mais (*Zea mays* L.) (Ribaut *et al.* 1997), il sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) (Subudhi *et al.* 2000) e la lattuga (*Lactuca sativa* L.) (Johnson *et al.* 2000). Inoltre, pochi lavori di ricerca sono stati realizzati sulla tolleranza alla siccità del pomodoro rispetto al volume di lavoro condotto sulla tolleranza a altri tipi di stress abiotici come la salinità e le temperature estreme.

Comunque, in un recente studio di valutazione del germoplasma, molte accessioni di pomodoro selvatico sono state identificate per l'abilità di germinare rapidamente sotto condizioni di stress idrico, che includono *S. pimpinellifolium* (Jusl.) Mill. accession LA722 (M.R. Foolad *et al.*, dati non pubblicati). Tra le specie selvatiche di pomodoro, *S. pimpinellifolium* è la più simile a *S. esculentum* (Rick 1958). Accessioni di questa specie producono frutti rossi e sono facilmente ibridizzate con il pomodoro coltivato. Inoltre, in paragone con altre specie di pomodoro, *S. pimpinellifolium* possiede poche caratteristiche orticulturali indesiderate ed è stata frequentemente usata come risorsa genetica nei programmi di genetica e di breeding.

In questo lavoro di tesi è stata confermata la maggiore tolleranza ad una ridotta reintegrazione delle perdite di acqua della IL9-2-5 rispetto al parentale coltivato M82. In particolare, prove comparative condotte in sistemi semi-controllati allevando la IL9-2-5 ed il parentale coltivato M82 a due differenti livelli di restituzione dell'acqua evapotraspirata e replicate in due località ed annate differenti, hanno consentito di verificare una significativa riduzione delle perdite di produzione conseguenti ad una riduzione dell'acqua restituita. Peraltro, tale linea di introgressione è risultata combinare una minore caduta della quantità di frutti prodotti con un maggiore contenuto in AsA sottolineando l'espressione nella IL9-2-5 di un QTL che regola la tolleranza a ridotti apporti idrici e l'incremento del contenuto in AsA del frutto maturo. Al momento non sono noti lavori che riportano l'identificazione di QTL per la tolleranza alla ridotta disponibilità di acqua in pomodoro attraverso l'uso delle IL.

La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano la risposta fisiologica della pianta a ridotti apporti idrici è strategica e funzionale per lo sviluppo di nuovi e più tolleranti genotipi adatti alla produzione in sistemi più sostenibili. Precedenti lavori hanno dimostrato che le piante non accettano passivamente gli stress ambientali ma rispondono attivamente attraverso la percezione dei segnali di stress idrico, che portano ad un aumento dell'espressione dei geni relazionati in modo da proteggere dal danno dello stress (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Durante i processi di risposta allo stress idrico, un gran numero di geni viene regolato. Questi geni possono essere classificati in due gruppi principali secondo le loro funzioni putative. Il primo gruppo comprende i geni che codificano per proteine

strutturali, effettori che agiscono a valle nel pathway di risposta allo stress e includono geni osmoregolatori, proteine antiossidanti, acquaporine, e proteine LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) (Bailly *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Il secondo gruppo comprende i geni che codificano per proteine regolatorie, che sono attivatori trascrizionali della risposta precoce allo stress, includono fattori di trascrizione e proteine chinasi. I principali fattori di trascrizione legati allo stress sono bZIP, WRKY, MYB, e le proteine AP2/EREBP giocano un ruolo importante nella regolazione della tolleranza alla siccità (Abe *et al.*, 1997; Finkelstein & Lynch, 2000; Marè *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005). Le proteine chinasi, includono le CDPK (*Calmodulin Dependent Protein Kinases*), MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), le RPK (*Receptor Protein Kinases*), e le proteine chinasi ribosomiali sono coinvolte nell'amplificazione della cascata di segnale in risposta a diversi fattori di stress (Mizoguchi *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 2004). L'espressione dei geni inducibili dalla siccità possono essere governati da sistemi regolatori ABA-dipendenti o ABA-indipendenti (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005). Ci sono anche ampi cross-talks tra le risposte alla siccità e altri tipi di stress ambientali come stress indotti dalla luce e stress biotici (Huang *et al.*, 2008). I cambiamenti dell'espressione genica sotto condizioni di stress idrico causano una serie di alterazioni fisiologiche e biochimiche. La fotosintesi è significativamente influenzata dallo stress idrico, che restringe la normale funzione di altri pathway metabolici, come la fissazione dell'azoto (Chaves *et al.*, 2009). Il pathway della respirazione, che prevede la scissione delle molecole complesse in composti semplici per provvedere all'energia richiesta per lo sviluppo della pianta, è accelerato sotto condizioni di stress idrico (Haupt-Herting *et al.*, 2001). I sistemi di protezione come il pathway antiossidante, che rinforza le cellule vegetali grazie alla produzione dei difensori dai ROS (*Reactive Oxygen Species*), sono influenzati dallo stress idrico (Apel & Hirt, 2004).

Nel lavoro di tesi, l'analisi trascrittomico effettuata su frutti raccolti allo stadio rosso maturo da M82 ed IL9-2-5 a due livelli di restituzione ha messo in evidenza una differente risposta di difesa nella IL9-2-5 quando confrontata con M82 a ridotti livelli di restituzione. Infatti, in M82 molti geni normalmente coinvolti nella risposta di difesa mostrano alterazioni del loro profilo di espressione ad un ridotto livello di restituzione come è il caso di due "dehydration responsive protein" ed una "1-

aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase” che mostrano sottoespressione, di due “kinase”, due “thioredoxin”, una “aspartic protease”, una “polygalacturonase” ed una “polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase” che mostrano sovraespressione, di una “8'-ABA hydroxylase” la cui sottoespressione è stata identificata mediante Real Time RT-qPCR. Confrontando, invece, il profilo di espressione della IL9-2-5 rispetto ad M82 a ridotti livelli di restituzione si nota la sottoespressione di alcuni geni di difesa quali una “aspartic protease”, una “purple acid phosphatase”, una “heat shock-like protein”, una “map kinase kinase”, una “cullin 3b”, una “polygalacturonase” ed una “polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase” mentre il trascritto annotato come “8'-ABA hydroxylase” evidenzia sovraespressione lasciando ipotizzare un maggiore controllo dell'ABA prodotto. Tali differenze nel profilo di espressione suggeriscono che la IL9-2-5 percepisce la ridotta disponibilità di acqua meno severamente e questo si potrebbe ripercuotersi anche sull'attività delle foglie vista la sottoespressione del trascritto dell'invertasi (LIN5) e di una “photoassimilate-responsive protein” in M82 sottoposto a ridotta reintegrazione delle perdite di acqua mentre la stessa “photoassimilate-responsive protein” risulta sovraespressa nei frutti di IL9-2-5 quando confrontata con M82 a ridotta restituzione di acqua. Questi cambiamenti sono anche indizio di una ridotta traslocazione di fotosintati nel frutto della M82 quando trattata con minore restituzione di acqua.

Per verificare l'ipotesi che la struttura dell'apparato radicale fosse implicata, almeno in parte nella maggiore tolleranza della IL9-2-5, nel corso del lavoro di tesi sono stati allestiti esperimenti che hanno consentito di identificare alcune differenze morfologiche rilevanti nella IL9-2-5. In particolare, l'apparato radicale della IL9-2-5 ha mostrato un maggiore sviluppo lineare rispetto ad M82 a carico sia delle radici avventizie che della radice primaria. Anche il numero di radici avventizie è risultato essere maggiore nella IL9-2-5. Tali risultati potrebbero *per se* giustificare, almeno in parte, una maggiore tolleranza della IL9-2-5 a ridotti apporti idrici attraverso una maggiore capacità di estrarre l'acqua dal terreno resa possibile da una maggiore superficie esplorata.

A causa delle conseguenze ambientali a lungo termine vi è la necessità di adottare strategie di gestione per intensificare la produzione negli ecosistemi agro-culturali (Matson *et al.* 1997). Due grandi problemi sono maggiormente presenti la

contaminazione di nitrato delle acque sotterranee e l'eccessivo consumo di risorse idriche limitanti. I sistemi radicali che potrebbero acquisire l'acqua e i nutrienti dal suolo vorrebbero minimizzare questi problemi. I progenitori selvatici delle piante coltivate tendono ad avere sistemi radicali che possono sfruttare i terreni più imprevedibili e stressanti rispetto alle loro controparti coltivate (Chapin *et al.* 1989; Jackson & Koch 1997). Gli apparati radicali più piccoli aumentano la propensione per il movimento e la perdita delle risorse del suolo al di là della portata delle radici. L'architettura delle radici descrive la configurazione spaziale del sistema radicale e descrive sia la topologia degli assi radicali che la distribuzione delle radici nel terreno (Lynch, 1995). Una pianta con la frazione minima necessaria della sua biomassa nelle radici è ottimale per la produttività delle colture annuali sotto regimi a basso stress ambientale tipico di agricolture ad alto impiego (Chapin *et al.* 1989; Jackson & Koch 1997; Siddique *et al.* 1990) in modo che la sostanza è proporzionata perfettamente agli organi raccolti. Un'architettura radicale che sfrutta il maggior volume possibile di terreno con una biomassa radicale più piccola possibile, è ottimale per la produttività sotto condizioni di crescita ad alto-impiego (Fitter, 1994). Piccoli apparati radicali superficiali sono in grado di raggiungere l'umidità e le sostanze nutritive in strati più bassi del suolo, in modo che gli ingressi frequenti di acqua e di nutrienti vengono adottati per evitare lo stress delle piante. Aumentando la profondità delle radici attraverso cambiamenti nell'architettura radicale si promuove un'assunzione più profonda delle risorse del suolo. Di due impianti a biomasse radicali identiche, la pianta con un apparato radicale profondo avrà accesso a zone di terreno più profondo e quindi a maggiori quantità di acqua e di sostanze nutritive. La diminuzione di assunzione di acqua e fertilizzanti sarà possibile perché meno acqua e sostanze nutritive tenderanno ad essere dilavate al di sotto della zona radicale.

Ci sono pochi dati disponibili sugli effetti che l'architettura radicale abbia sull'esplorazione delle risorse del suolo (Fitter, 1994; Eissenstat, 1997; Berntson 1994). Ciò è in parte dovuto alle difficoltà della misurazione delle caratteristiche radicali e del rendimento del suolo. Molti studi dettagliati sono stati condotti sulla lattuga (*Lactuca spp.*). La lattuga coltivata, *Lactuca sativa L.*, si è adattata a sistemi agricoli che impiegano alte quantità di nutrienti e irrigazioni frequenti (Lorenz &

Maynard 1988), con le conseguenze ambientali della lisciviazione del nitrato e comunemente inquinato dalle falde acquifere (Snow *et al.* 1988).

La lattuga, ha un sistema di radici superficiali con un fittone corto e prolifico di rami laterali negli strati superiori del terreno (Jackson, 1995). La specie selvatica, *L. Serriola*, è resistente alla siccità (Werk & Ehleringer 1985), sviluppa un fittone lungo che le consente di prelevare l'acqua dalle zone profonde del terreno durante la siccità superficiale del suolo, e mostra un livello inferiore di plasticità dello sviluppo radicale rispetto alla lattuga coltivata (Jackson, 1995; Gallardo *et al.* 1996).

Altri lavori riportano che la patata è una coltura sensibile alla siccità, di conseguenza il deficit idrico può essere difficile da gestire perché può causare riduzioni di resa dei tuberi e della qualità anche se sottoposta a brevi periodi di stress idrico (Vos & Haverkort, 2007; Shock & Feibert, 2002). Il pomodoro (*Solanum esculentum* Mill.) ha la più alta superficie di colture orticole nel mondo e i metodi di irrigazione a goccia sono ampiamente utilizzati nella loro produzione (Zegbe *et al.*, 2003). Il fabbisogno idrico per campo di pomodoro è circa 400-600 mm di acqua entro un periodo di 75-125 giorni dall'inizio dell'allegagione. Il pomodoro può tollerare la siccità in una certa misura (André & Churata-Masca, 1992; Baradas, 1994; Hanson & May, 2004). Pertanto l'adozione di deficit idrico del sottosuolo per le colture potrebbe risparmiare una notevole quantità di acqua.

Il lavoro di tesi ha evidenziato un effetto significativo in entrambe le prove del livello di restituzione dell'acqua sulla consistenza nel solo genotipo non tollerante M82 dove la maggiore consistenza è stata osservata nel trattamento che ha previsto un minore apporto idrico. La IL9-2-5, invece, non ha fatto registrare variazioni significative della consistenza al variare della restituzione di acqua. Altro risultato interessante è stata la maggiore consistenza osservata nella IL9-2-5 nel trattamento con la reintegrazione completa delle perdite di acqua che però è risultata significativa solo nella I prova. La IL9-2-5, inoltre, ha mostrato una consistenza inferiore ad M82 nel trattamento con ridotta restituzione, differenza che è risultata significativa solo nella II prova. In definitiva si può concludere che la IL9-2-5 ha mostrato una maggiore stabilità della consistenza del frutto al variare della disponibilità di acqua dato che in nessuna delle due prove mostra una differenza significativa tra i due trattamenti di restituzione idrica. L'analisi Microarray, inoltre, ha evidenziato che i

differenti andamenti nella consistenza del frutto in risposta alla restituzione di acqua sono associati a variazioni nell'espressione di geni coinvolti nella sintesi e nella degradazione delle pectine e di geni coinvolti nella sintesi dell'etilene. Normalmente piante sottoposte a stress idrico modificano sia l'espansione cellulare che l'estensione della parete cellulare. Quest'ultima è controllata da strutture della parete cellulare e da proteine che modificano la parete cellulare come le espansine (McQueen-Mason *et al.*, 1992), XTH (Rose *et al.*, 2002), e glucanasi (Li *et al.*, 2003), pectate lyases, polygalacturonasi (Hadfield & Bennett, 1998) e cellulasi. In tutti questi casi i livelli di espressione si abbassano notevolmente quando la pianta è sottoposta a stress idrico (Bray, 2004). L'etilene è un ormone finemente regolato da segnali interni durante lo sviluppo e in risposta a stimoli ambientali, come stress abiotici o biotici. I geni che regolano la sua sintesi sono l'ACC syntasi (ACS) (Sato & Theologis, 1989) e ACC ossidasi (ACO) (Hamilton *et al.*, 1991; Spanu *et al.*, 1991). Questi enzimi appartengono a una famiglia di geni e sono regolati da una complessa rete di segnali di sviluppo e ambientali che rispondono a stimoli sia interni che esterni (Johnson & Ecker, 1998).

Studi precedenti hanno riportato l'identificazione di QTL per la consistenza del frutto in pomodoro mediante lo studio delle IL di *S. pennelli* (tesi di dottorato della Dott.ssa A. Sacco). Di questi QTL, uno è stato identificato nella IL9-1-5. QTL per la consistenza del frutto sono stati anche mappati sul cromosoma 9 e sul 4 mediante l'uso di una popolazione di RIL (Saliba-Colombani *et al.*, 2001) derivata dall'incrocio di una linea di pomodoro *S. lycopersicum* var. cerasiforme con un'altra linea che produceva frutti più grandi di *S. lycopersicum*. Inoltre i QTL per la consistenza del frutto presente sul cromosoma 4 e sul 9 sono stati identificati in QTL omologhi utilizzando l'incrocio tra *S. pimpinellifolium* (Tanksley *et al.*, 1996) e *S. peruvianum* (Fulton *et al.*, 1997). Tutti questi risultati sottolineano che il background genetico ed i fattori ambientali e pedoclimatici oltre ad avere un impatto diretto sull'espressione dei QTL per la struttura del frutto mostrano anche una interazione tra di essi (Bernacchi *et al.*, 1998; Chaib *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda il contenuto in solidi solubili, nell'ambito del lavoro di tesi è stato evidenziato un incremento significativo, in entrambi i genotipi (tab. 3.4) al diminuire della restituzione di acqua. Tale risultato si spiega probabilmente con la variazione del contenuto in acqua nel frutto al variare della disponibilità di acqua nel

suolo. Inoltre, in entrambe le prove è stato ottenuto un contenuto in solidi solubili significativamente maggiore nella IL9-2-5 quando le perdite di acqua sono state reintegrate al 100%. Nel trattamento che ha previsto la restituzione della sola metà dell'acqua perduta, il maggiore contenuto in solidi solubili nella IL9-2-5 rispetto ad M82 è stato verificato solo nella prova del 2011. Quindi si può concludere che in generale il contenuto in solidi solubili aumenta al diminuire della disponibilità di acqua nel suolo e che la IL9-2-5 può esprimere, in definite condizioni di disponibilità di acqua, un QTL per il contenuto in °brix del frutto maturo.

Il maggiore contenuto in solidi solubili nella IL9-2-5 è riconducibile alla dimostrata maggiore attività invertasica dei tessuti vegetativi e dei frutti di questa linea. Infatti, una dettagliata caratterizzazione della IL9-2-5 rivela la presenza dell'allele selvatico *Lin5* che determina la produzione di una invertasi con maggiore attività specifica ed un maggior livello di °brix (Baxter *et al.*, 2005). In particolare è stato notato che la IL9-2-5 ha un'augmentata capacità di scaricare saccarosio dal floema e questo aggiunge un supporto fisiologico alle conclusioni tratte da Fridman e colleghi (2004) sul ruolo chiave giocato dall'invertasi apoplastica LIN5. Tuttavia, è anche da tenere in considerazione che una minore inibizione dell'attività fotosintetica e della traslocazione di fotosintati suggerita dalla sovraespressione della "8'-ABA hydroxylase" e della "photoassimilate-responsive protein" possa essere il risultato di una migliore stato di idratazione della pianta reso possibile da una sua maggiore capacità di estrarre acqua dal terreno in condizioni di ridotta disponibilità della risorsa.

La base genetica dell'accumulo di saccarosio nelle specie selvatiche di pomodoro è stato altamente studiato utilizzando le linee di Introgressione (Yelle *et al.*, 1991; Fridman *et al.*, 2000, 2004). Diversi QTL per il contenuto di zucchero e acidi sono stati mappati (Causse *et al.*, 2002, 2004; Fulton *et al.*, 2002; Lecomte *et al.*, 2004). Eshed e Zamir (1995) hanno valutato 50 IL di *S. pennelli* in Israele, e hanno riportato un numero minimo di 23 QTL per °brix.

Fulton *et al.* (2002) hanno identificato in differenti popolazioni interspecifiche alleli che aumentavano il contenuto di zucchero ed alleli con effetti positivi o negativi sul contenuto acidi organici. Altri studi (Saliba-Colombani *et al.*, 2001; Fulton *et al.*, 2002) hanno messo in evidenza la colinearità dei QTL per gli acidi e gli zuccheri in

differenti specie selvatiche e la colocalizzazione, che si verifica in molti casi, tra QTL per zuccheri e QTL per acidi organici (Fulton *et al.*, 2002).

Tra i risultati più interessanti di questo lavoro di tesi, l'incremento in AsA nel frutto maturo della IL9-2-5 rispetto ad M82 a ridotti livelli di restituzione idrica apre prospettive di utilizzazione del QTL 9-2-5 nello sviluppo di nuovi genotipi per produzioni di qualità e più sostenibili. Peraltro, è stato osservato che M82, in condizioni di ridotta disponibilità idrica oltre a subire una drastica riduzione di produttività presenta una caduta drammatica del contenuto in AsA a mentre la IL9-2-5 non presenta variazioni significative del contenuto in AsA al diminuire della disponibilità di acqua. Il maggior contenuto in AsA nella IL9-2-5 potrebbe peraltro essere implicato in una risposta di maggiore tolleranza.

Nelle piante l'attività antiossidante dell'AsA rende questa sostanza un componente cruciale nelle risposte agli stress (Conklin, 2004) e nella trasduzione del segnale di difesa e di sviluppo (Pastori, 2003). Per adempire un ruolo così importante, la sintesi dell'acido ascorbico deve essere finemente regolata. Differenti pathway alternativi sono stati identificati ma resta comunque difficile definire esattamente come la sintesi sia controllata nel contesto dello sviluppo, in risposta agli stress e nella normale omeostasi (Valpuesta, 2004; Di Matteo *et al.*, 2010). Molti geni sono stati implicati nel controllo del livello di AsA nel frutto di pomodoro. La quantità di AsA nelle cellule vegetali dipende da una fine regolazione della sua sintesi (Smirnoff *et al.* 2001), dal riciclo metabolico e dalla degradazione (Green *et al.* 2005), e, infine, dal suo trasporto (Horemans *et al.* 2000). Il riciclo dell'AsA è particolarmente importante sotto condizioni di stress perché l'AsA ridotto è convertito in un radicale instabile (MDA), che si dissocia in AsA e DHA. Poiché quest'ultimo è instabile e viene rapidamente degradato, il pool di ASA può essere impoverito se le forme ossidate non vengono recuperate da due reductasi: Monodeidroascorbato reductasi (MDHRA) e la deidroascorbato reductasi (DHAR) (Smirnoff *et al.* 2000). Entrambi gli enzimi sono stati studiati in ingegneria genetica, la loro sovra espressione porta ad un aumento dei livelli di AsA (Chen *et al.* 2003) e nel caso della MDHAR, un aumento della tolleranza agli stress (Eltayeb *et al.* 2007).

L'analisi trascrittomico ha evidenziato che la caduta nel contenuto in AsA nei frutti di M82 allevati a ridotti livelli di reintegrazione idrica, è associata alla diminuita espressione di due trascritti putativamente coinvolti in passaggi chiave della via

biosintetica di Smirnoff e che corrispondono ad una "GDP-mannose pyrophosphorylase" e ad una "GDP-L-galactose phosphorylase" mentre la sovraespressione di alcune "monodehydroascorbate reductase" potrebbe rappresentare solo una risposta ad una condizione di stress ed al tentativo di ristabilire l'omeostasi. Inoltre, la sottoespressione di geni chiave della via di Smirnoff potrebbe essere il risultato di una riduzione della disponibilità di carboidrati nel frutto compromessa dalla riduzione dell'attività foto sintetica e della traslocazione di fotosintetati come suggerito dalla sovra espressione della "8'-ABA hydroxylase" e dalla sottoespressione dell'invertasi (LIN5) e della "photoassimilate-responsive protein" ma anche dalla sottoespressione di una "udp-glucose dehydrogenase" e di due geni coinvolti nella degradazione ossidativa dei carboidrati, la "phosphoglycerate mutase" e la "glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". Tali meccanismi regolativi fanno suggerire un tentativo, nel frutto di M82, di risparmio di carboidrati il cui apporto dai tessuti "source" potrebbe essere già limitante.

Parallelamente, il maggior contenuto di AsA nella IL9-2-5 allevata in condizioni di ridotta restituzione di acqua potrebbe essere il risultato di una maggiore disponibilità di carboidrati nel frutto garantita attraverso da una minore percezione della ridotta disponibilità di acqua e da una attività foto sintetica e traslocativa più efficiente. In questo modo, nella IL9-2-5 i carboidrati sarebbero maggiormente disponibili per essere preferenzialmente canalizzati nel flusso biosintetico dell'AsA. Inoltre, la sottoespressione di alcune "monodehydroascorbate reductase" e "dehydroascorbate reductase" potrebbe essere legata ad una minore reazione ad una situazione di stress nella IL9-2-5 più che contribuire al maggiore accumulo di AsA.

In particolare, i risultati del lavoro di tesi evidenziano che una riduzione dell'accumulo di fenoli totali nel frutto di pomodoro è associata ad una incrementata espressione di un gene annotato come "phenylalanine ammonia-lyase". Il passaggio enzimatico catalizzato dalla "phenylalanine ammonia-lyase" corrisponde ad una reazione

chiave nella regolazione della sintesi dei fenylpropanoidi come dimostrato da lavori pubblicati su autorevoli riviste (Chang *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 1999; Dixon, 2001). L'incremento di espressione della "phenylalanine ammonia-lyase" nel frutto di M82 al diminuire della disponibilità di acqua potrebbe rappresentare un tentativo di

ristabilire l'omeostasi da parte di un sistema perturbato. Inoltre, la sovra espressione della "phenylalanine ammonia-lyase" è accompagnata dalla riduzione dell'espressione di un "r2r3-myb transcription factor", una "anthocyanidin synthase" ed una "cinnamoylreductase" che potrebbero essere coinvolti nella riduzione del flusso biosintetico verso la produzione di antocianine ed acidi cinnamici per la condensazione nelle lignine. Nel lavoro di Rouseaux e collaboratori (2005) hanno individuato nove QTL positivi e otto negativi per i fenoli totali nel frutto di pomodoro utilizzando la popolazione IL di *S. pennellii*. La maggior parte degli studi effettuati sulla regolazione dell'espressione dei fenoli nel frutto di pomodoro hanno focalizzato l'attenzione sulla sovra-espressione dei geni codificanti per la biosintesi (Verhoeven *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2008), sui fattori di trascrizione (Bovy *et al.*, 2002) o sulla soppressione di geni regolatori (Davuluri *et al.*, 2005; Adato *et al.*, 2009).

Infine, nel presente lavoro è stata osservato un incremento del livello di carotenoidi totali sia in M82 che in IL9-2-5 a ridotti livelli di restituzione di acqua. Tuttavia, l'effetto è risultato essere di intensità maggiore in M82 dove la sovra espressione di una "1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase" è accompagnata ad una probabile riduzione del catabolismo dell'ABA attraverso la sottoespressione della "ABA 8'-hydroxylase CYP707A1. Questo meccanismo regolativo è probabilmente frutto di una maggiore reazione allo stress in M82 e risulta da un incremento del flusso biosintetico verso i carotenoidi ed una minore fuoriuscita di carbonio dal flusso attraverso una minore degradazione dell'ABA. La via biosintetica dei carotenoidi è stata molto studiata nel frutto di pomodoro dove i principali meccanismi di regolazione riguardano i geni della geranylgeranyl difosfato sintasi (GGPPS) e della fitoene sintasi (PSY) (von Lintig *et al.*, 1997; Welsch *et al.*, 2000).

Riassumendo, il presente lavoro di tesi ha permesso di identificare il QTL9-2-5 la cui espressione è coinvolta nell'incremento della tolleranza ad una ridotta restituzione di acqua ed un maggior contenuto in AsA nel frutto. La maggiore tolleranza della IL9-2-5 è anche stata messa in relazione ad un maggiore sviluppo lineare dell'apparato radicale. L'analisi trascrittomica del frutto ha consentito di identificare geni candidati coinvolti nella regolazione della consistenza, del contenuto in solidi solubili, in AsA, fenoli totali e carotenoidi nel frutto che potranno essere utilizzati in futuro per lo sviluppo di approcci di ingegneria metabolica della qualità. La caratterizzazione funzionale di tali geni potrà verificare il loro ruolo nel controllo dei

differenti aspetti della qualità del frutto. Inoltre, i risultati acquisiti in questo lavoro di tesi potranno essere utilizzati per lo sviluppo di nuovi genotipi di pomodoro dotati di maggiore tolleranza allo stress idrico ed una maggiore qualità del frutto attraverso programmi di miglioramento genetico di precisione.

Conclusioni

La ricerca ha avuto come obiettivo generale lo studio dei meccanismi genetici di regolazione della tolleranza della pianta ad un ridotto apporto idrico e della qualità del frutto di pomodoro in risposta ad un ridotto apporto idrico. In particolare, gli obiettivi specifici del presente lavoro di tesi sono stati: 1. l'identificazione e la caratterizzazione di un locus quantitativo (QTL) che modula la risposta della pianta alla riduzione della disponibilità di acqua in termini di quantità e qualità della produzione; 2. l'identificazione di caratteri morfologici associati alla tolleranza a ridotti apporti idrici; 3. l'identificazione di geni candidati coinvolti nel controllo della qualità del frutto in risposta a stati di deficienza idrica. A tale scopo è stata utilizzata una linea di introgressione (IL9-2-5) recante allo stato omozigote un segmento del cromosoma 9 introgresso dalla specie selvatica *Solanum pennellii* nel background genomico della varietà coltivata M82, mediante l'uso di marcatori molecolari ad esso associati. In particolare, la IL9-2-5 è stata scelta dato che mostrava una elevata produttività in precedenti prove di campo in sistemi di coltivazione con ridotto apporto irriguo.

La IL9-2-5 è stata sottoposta ad una prova comparativa con la varietà M82 in sistemi semi-controllati e a due livelli di restituzione dell'acqua perduta rispetto alla capacità di campo. La prova è stata ripetuta due volte, nel 2009 e nel 2011, nel primo caso presso l'Università di Bari in collaborazione con il Prof. L. Ricciardi e nel secondo caso presso il Dipartimento di afferenza. In particolare, i due trattamenti idrici utilizzati nella prova sono consistiti rispettivamente nella restituzione del 100 e del 50% dell'acqua perduta per evapotraspirazione. La valutazione della produttività ha consentito di verificare la maggiore tolleranza della IL9-2-5 dato che in questa linea è stata osservata una minore riduzione in peso della produzione in condizioni di allevamento con ridotta restituzione di acqua (50%). Inoltre, nell'ambito dei parametri di qualità della produzione, la IL9-2-5 ha mostrato un maggiore contenuto nel frutto maturo in acido ascorbico (Vitamina C) in condizione di ridotta disponibilità idrica. In base a precedenti osservazioni era stato ipotizzato che la maggiore tolleranza della IL9-2-5 potesse essere attribuita ad una differente architettura dell'apparato radicale. Per verificare tale ipotesi sono state anche condotte degli esperimenti volti ad una caratterizzazione morfologica dell'apparato radicale. In particolare, prove effettuate

allevando le piante in differenti condizioni hanno evidenziato un maggiore sviluppo lineare dell'apparato radicale della IL9-2-5.

Infine, l'analisi trascrittomiche dei frutti raccolti allo stadio rosso maturo sulle piante della IL9-2-5 ed M82 allevate ai due livelli di restituzione di acqua ha consentito di identificare geni candidati nel controllo dell'espressione di caratteri legati alla qualità del frutto in risposta ad un ridotto apporto idrico. In particolare, geni coinvolti nel trasporto dei fotoassimilati, del metabolismo delle pectine e dell'acido abscissico, della sintesi e riciclo dell'acido ascorbico hanno evidenziato pattern di regolazione differenti nei due genotipi associati a variazioni della qualità del frutto in risposta ad un ridotto apporto idrico. In conclusione, il lavoro di questa tesi ha consentito di identificare un QTL che modula la tolleranza ad una ridotta disponibilità di acqua ed influenza la qualità del frutto. Tale tolleranza è stata anche messa in relazione con un differente sviluppo dell'apparato radicale, mentre geni candidati per il controllo della qualità del frutto di pomodoro in risposta alla carenza di acqua nel terreno sono anche stati identificati. I risultati ottenuti aprono ad interessanti sviluppi futuri in termini di produzione di nuove linee tolleranti allo stress idrico ed adatte a sistemi di gestione più sostenibili dal punto di vista economico ed ambientale ed al tempo stesso in grado di dare produzioni di qualità.

5. Bibliografia

Abbott J.A. Textural quality assessment for fresh fruits and vegetables. *Quality of Fresh and Processed Foods* **2004** 542, 265–279.

Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D, Shinozaki K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *The Plant Cell* **1997** 9, 1859–1868.

Adato A., Mandel T., Mintz-Oron S., Venger I., Levy D., Yativ M., Domínguez E., Wang Z., De Vos R., Jetter R., Schreiber L, Heredia A., Rogachev I., Aharoni A. Fruit-Surface Flavonoid Accumulation in Tomato Is Controlled by a SIMYB12-Regulated Transcriptional Network *PLoS Genet.* **2009** 5(12): e1000777.

Alba R., Fei Z., Payton P., Liu Y., Moore S. L., Debbie P., Cohn J., D'Ascenzo M., Gordon J. S., Rose J. K. C., Martin G., Tanksley S. D., Bouzayen M., Jahn M. M., Giovannoni J. ESTs, cDNA microarrays, and gene expression profiling: Tools for dissecting plant physiology and development. *Plant J* **2004** 39, 697-714.

Alba R., Payton P., Fei Z., McQuinn R., Debbie P., Martin G. B., Tanksley S. D., Giovannoni J. J. Transcriptome and Selected Metabolite Analyses Reveal Multiple Points of Ethylene Control during Tomato Fruit Development. *Plant Cell.* **2005** 17(11): 2954-2965.

André, R.G.B., Churata-Masca, M.G.C. Water requirement and crop coefficient for processing tomatoes. *Acta Hortic.* **1992** 301, 165–170.

Apel K, Hirt H.. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **2004** 55, 373–399.

Bailly C, Audigier C, Ladonne F, Wagner MH, Coste F, Corbineau F, Co[^]me D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* **2001** 52, 701–708.

Baradas, M.W. Crop water requirements. Tropical crops. In: Griffiths, J.F. (Ed.), *Handbook of Agricultural Meteorology*. Oxford University Press, Oxford, UK, **1994**, 189–209.

Barber G. A. Observations on the mechanism of the reversible epimerization of GDP-D-mannose to GDP-L-galactose by an enzyme from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Biological Chemistry*, **1979** 254, 7600-7603.

Bartley, G.E., Coomber, S.A., Bartholomew, D.M., and Scolnik, P.A. Genes and enzymes for carotenoid biosynthesis. In *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, L. Bogorad and I.K. Vasil, eds (New York: Academic Press), **1991a** 78, 331-364.

Bartley G, Scolnik P. cDNA cloning expression during fruit development and genome mapping of PSY2, a second tomato gene encoding phytoene synthase. *J Biol Chem* **1993** 268, 25718-25721

Bartley, G.E., Viltanen, P.V., Pecker, I., Chamovitr, D., Hirschberg, J., and Scolnik, P.A. Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. Proc.

Natl. Acad. Sci. USA **1991b** 88, 6532-6536.

Bartley, G.E., Viltanen, P.V., Bacot, K.O., and Scolnik, P.A. A tomato gene expressed during fruit ripening encodes an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. J. Biol. Chem. **1992** 267, 5036-5039.

Batu A. Some Factors Affecting on Determination and Measurement of Tomato Firmness. *J. of Agriculture and Forestry* **1998** 22, 411-418.

Baxter C.J., Carrari F., Bauke A., Overy S., Hill S.A., Quick P.W., Fernie A.R., Sweetlove L.J. Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant and Cell Physiology* **2005** 46, 425-437.

Bernacchi D., Beck-Bunn T., Emmatty D., Eshed Y., Inai S., Lopez J., Petiard V., Sayama H., Uhlig J., Zamir D., Tanksley S.D. Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* **1998** 97, 170-180.

Berntson GM. Modeling root architecture: are there tradeoffs between efficiency and potential of resource acquisition? *New Phytol* **1994** 127, 483-493

Bino R. J., Ric de Vos C. H., Lieberman M., Hall R. D., Bovy A., Jonker H. H., Tikunov Y., Lommen A., Moco S., Levin I. The light-hyperresponsive high pigment-2dg mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytol.* **2005** 166, 427-438.

Boyer JS. Plant productivity and environment. *Science* **1982** 218, 443-448.

Bovy A., de Vos R., Kemper M., Schijlen E., Pertejo M.A., Muir S., Collins G., Robinson S., Verhoeyen M., Hughes S., Santos-Buelga C., van Tunen A. High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes *LC* and *C1*. *Plant Cell.* **2002** 14, 2509-2526.

Bramley, P., Teulieres, C., Blain, I., Bird, C., and Schuch, W. Biochemical characterization of transgenic tomato plants in which carotenoid synthesis has been inhibited through the expression of antisense RNA to pTOM5. *Plant J.* **1992** 2, 343-349.

Bray EA. Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **2004** 55, 2331-2341.

Bray EA, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. In W Grissem, B Buchanan, R Jones, eds, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, **2000**, 1158-1249

Breton G, Danyluk J, Charron JBF, Sarhan F. Expression profiling and bioinformatic analyses of a novel stress-regulated multispansing transmembrane protein family from cereals and Arabidopsis. *Plant Physiology* **2003** 132, 64–74.

Brummell D.A., Harpster M.H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **2001** 47, 311–340.

Brummell DA. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology* **2006** 33, 103–119.

Butelli E., Titta L., Giorgio M., Mock H.P., Matros A., Peterek S., Schijlen E G W M, Hall R. D., Bovy A. G, Luo J., et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. *Nature Biotechnology* **26**, 1301-1308 (26 October **2008**) doi:10.1038/nbt.1506 Research.

Carrari F., Fernie A.R. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany* **2006** 57, 1883–1897.

Causse M., Buret M., Robini K., Verschave P. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *Journal of Food Science* **2003** 68, 2342–2350.

Causse M., Duffe P., Gomez M.C., Buret M., Damidaux D., Zamir D., Gur A., Chevalier M., Lemaire-Chamley M., Rothan C. A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany* **2004** 403, 1671–1685.

Causse M., Saliba-Colombani V., Lecomte L., Duffe P., Rousselle P., Buret M. QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: a few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany* **2002** 53, 2089–2098.

Chaib J., Lecomte L., Buret M., Causse M. Stability over genetic backgrounds, generations and years of quantitative trait *locus* (QTLs) for organoleptic quality in tomato. *Theor. Appl. Genet.* **2006** 112, 934–944.

Chang A., Lim M.H., Lee S., Robb J., Nazar R N.J. Tomato Phenylalanine Ammonia-Lyase Gene Family, Highly Redundant but Strongly Underutilized *Biol Chem.* **2008** 28; 283(48): 33591–33601.

Chapin FS, Groves RH, Evans LT. Physiological determinants of growth-rate in response to phosphorus supply in wild and cultivated *Hordeum* species. *Oecologia* **1989** 79, 96–105.

Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* **2009** 103, 551–560.

Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR: Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **2003**, 100, 3525-3530.

Clinton S. K. Lycopene: chemistry, biology and implications for human health and disease. *Nutr. Rev.*, **1998**, *56*, 35-51.

Conesa A., Götz S., Gómez J. M. G., Terol J., Talón M. e Robles M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Oxford Journals Life Sciences Bioinformatics Volume* **2005** *21* (18), 3674-3676.

Conklin PL and Barth C, Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens and the onset of senescence. *Plant Cell Environ* **2004** *27*, 959–970

Davey M. W., Gilot C., Persiau G., Ostergaard J., Han Y., Bauw G. C., Van Montagu M. C. Ascorbate Biosynthesis in Arabidopsis Cell Suspension Culture. *Plant Physiology*, **1999** *121*, 535-543.

Davey M. W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N. Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000** *80*, 825-860.

Davuluri G.R., van Tuinen A., Fraser P.D., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.R., Palys J., Uhlig J., et al. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nat Biotechnol* **2005** *23*, 890–895.

DellaPenna D, Pogson BJ. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *Annu Rev Plant Biol.* **2006** *57*, 711-38.

Demmig-Adams B, Adams WW III. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1992** *43*, 599-626

Demmig-Adams B, Adams WW III. Photosynthesis – harvesting sunlight safely. *Nature* **2000** *403*, 231

Deutsch J. C. Spontaneous hydrolysis and dehydration of dehydroascorbic acid in aqueous solution. *Anal Biochem*, **1998**, *260*, 223-229.

Devaux MF, Barakat A, Robert P, Bouchet B, Guillon F, Navez B, Lahaye M. Mechanical breakdown and cell wall structure of mealy tomato pericarp tissue. *Postharvest Biology and Technology* **2005** *37*, 209–221.

Di Mascio P., Kaise S., Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid single oxygen quencher. *Archn. Biochem. BioPhys.*, **1989**, *274*, 532-538.

Di Matteo A., Sacco A., Anacleria M., Pezzotti M., Delledonne M., Ferrarini A., Frusciante L., Barone A. The ascorbic acid content of tomato fruits is associated with the expression of genes involved in pectin degradation. *BMC Plant Biology*. **2010**

10,163.

Di Vaio C., Ritieri A. Indici di maturazione e qualità nel pesco IV Convegno nazionale sulla Peschicoltura Meridionale. Campobiello di Licata ed Agrigento 11-12 settembre **2003**.

Dixon RA. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. **2001** 411, 843–847.

Dixon R.A. Engineering of plant natural product pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005** 8, 329–336.

Dorais, M.; Ehret, D. L.; Papadopoulos, A. P. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: From the seed to the consumer. *Phytochem. Rev.* **2008**, 7, 231–250

Duthie G., Crozier A. Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Lipidology* **2000** 11, 43–47.

Eissenstat DM. Trade-offs in root form and function. In: Jackson LE, (ed) *Ecology in Agriculture*, Academic Press, San Diego, **1997**, 173–199

Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K: Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **2007**, 225, 255-1264.

Eshed, Y., and D. Zamir. Introgressions from *Lycopersicon pennellii* can improve the soluble solids yield of tomato hybrids, *Theor. Appl. Genet.* **1994** 88: 891-897

Eshed, Y. and Zamir, D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL. *Genetics* **1995** 141, 1147–1162.

Eshed Y., Gera G., Zamir D. A genome-wide search for wild-species alleles that increase horticultural yield of processing tomato. *Theoretical and Applied Genetics* **1996** 93, 877–886.

Fernie A.R., and Willmitzer, L. Carbohydrate metabolism. In *The Handbook of Plant Biotechnology*, P. Christou and H.K. Klee, eds (Chichester, UK: Wiley), **2004** 1230–1262.

Finkelstein RR, Lynch TJ. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *The Plant Cell* **2000** 12, 599–609.

Fitter A. Architecture and biomass allocation as components of the plastic response of root systems to soil heterogeneity. In: Caldwell MM, Pearcy RW (eds) *Exploitation of Environmental Heterogeneity by Plants*. Academic Press, San Diego, **1994**, 305–323

Foolad M.R. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *Int J Plant Genomics* **2007**, 1–52.

Forkmann G., Martens S. Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*. **2001** 12, 155–160.

Foyer, C. Ascorbic acid. *In: Antioxidants in Higher Plants*. R.G. Alscher and J.L. Hess (eds) CRC Press, Boca Raton, **1993**, 31-58.

Foyer C. H., Lelandais M., Edwards E. A., Mullineaux P. The role of ascorbate in plants, interactions with photosynthesis, and regulatory significance, in *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. Ed by Pell E e Steffen K, American Society of Plant Physiologists, Rockville, **1991**, 131-144.

Foyer C., Halliwell, B. Presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **1976**, 133, 21-25.

Franceschi S., Bidoli E., La Vecchia C., Talamini R., D'Avanzo B., Negri E. Tomatoes and risk of digestive-tract cancers. *Int. J. Cancer*, **1994**, 59, 181-184.

Fraser P, Kiano J, Truesdale M, Schuch W, Bramley P. Phytoene synthase-2 enzyme activity in tomato does not contribute to carotenoid synthesis in ripening fruit. *Plant Mol Biol* **1999** 40, 687-698.

Frary A, Doganlar S, Frampton A, Fulton T, Uhlig J, Yates H, Tanksley S. Fine mapping of quantitative trait loci for improved fruit characteristics from *Lycopersicon chmielewskii* chromosome 1. *Genome* **2003** 46, 235–243.

Fray A., Nesbitt T.C., Grandillo S., Knapp E., Cong B., Liu J., Meller J., Elber R., Alpert K.B., Tanksley S.D. *fw2.2*: a quantitative trait *locus* key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, **2000** 289, 85-88.

Fridman, E. and Zamir, D. Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2003** 131, 603–609.

Fridman, E., Carrari, F., Liu, Y.S., Fernie, A.R. and Zamir, D. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **2004** 305, 1786–1789.

Fridman, E., Liu, Y.S., Carmel-Goren, L., Gur, A., Shores, M., Pleban, T., Eshed, Y. and Zamir, D. Two tightly linked QTLs modify tomato sugar content via different physiological pathways. *Mol. Genet. Genomics* **2002** 266, 821–826.

Fridman, E., Pleban, T. and Zamir, D. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **2000** 97, 4718–4723.

Fridman E., Carrari F., Liu Y.S., Fernie A.R., Zamir D. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science* **2004** 305, 1786–1789.

Frusciante L., Carli P., Ercolano M.R., Pernice R., Di Matteo A., Fogliano V., Pellegrini N. Antioxidant nutritional quality of tomato, *Mol. Nutr. Food Res.* **2007** *51*, 609–617

Fulton T.M., Bucheli P., Voirol E., Lopez J., Pétiard V., Tanksley S.D. Quantitative trait loci (QTL) affecting sugars, organic acids, and other biochemical properties possibly contributing to flavor, identified in four advanced backcross populations of tomato. *Euphytica* **2002** *127*, 163–177.

Fulton TM, Beck-Bunn T, Emmatty D, Eshed Y, Lopez J, Petiard V, Uhlig J, Zamir D, Tanksley SD. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. *Theor Appl Genet* **1997** *95*, 881–894.

Gallardo M, Jackson LE, Thompson RB. Shoot and root physiological responses to localized zones of soil moisture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp.). *Plant Cell Environ* **1996** *19*: 1169–1178

Gey, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. A critical and constructive review of epidemiology and supplementation data regarding cardiovascular disease and cancer. *Biofactors*, **1998** *7*, 113-174.

Ghassemian M., Lutes J., Chang H., Lange I., Chen W., Zhu T., Wang X., Lange B. M.. Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*, **2008**, *69*, 2899–2911

Gilliland L.U., Magallanes-Lundback M., Hemming C., Supplee A., Koornneef M., Bentsink L., and Dellapenna D. Genetic basis for natural variation in seed vitamin E levels in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006** *103*, 18834–18841.

Giorio G, Stigliani AI, D'ambrosio C. Phytoene synthase genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) - new data on the structures, the deduced amino acid sequences and the expression patterns. *FEBS J* **2008** *275*, 527-535

Giovannoni J.J. Breeding new life into plant metabolism. *Nat. Biotechnol.* **2006** *24*, 418–419.

Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E. B., Meir J., Stampfer M. I., Colditz C. A., Willer W. C. Intake of carotenoids and Retinol in relation to risk of prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1995** *87*, 1767-1767.

Giuliano G., Aquilani R., Dharmapuri S. Metabolic engineering of plant carotenoids. *Trends Plant Sci* **2000** *5*, 406–409.

Godt, D.E. and Roitsch, T. Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiol.* **1997** *115*, 273–282.

Goff S., Klee H. Plant Volatile Compounds: Sensory Cues for Health and Nutritional Value? *Science* **2006** *311*, 815–819.

Green MA, Fry SC: Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-Ooxalyl- L-threonate. *Nature* **2005**, 433, 83-87.

Griffiths R.I., Whiteley A.S., O'Donnell A.G., Bailey M.J.. Rapid Method for Coextraction of DNA and RNA from Natural Environments for Analysis of Ribosomal DNA- and rRNA-Based *Microbial Community Composition*. *Applied and Environmental Microbiology* **1999** 66, 5488–5491.

Grotte M., Cadot Y., Poussier A., Loonis D., Piétri E., Duprat F., Barbeau G.. Détermination du degré de maturité des baies de raisin par des mesures physiques: aspects méthodologiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **2001** 35, 87–98.

Guo PG, Baum M, Grando S, Ceccarelli S, Bai GH, Li RH, von Korff M, Varshney RK, Graner A, Valkoun J. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *Journal of Experimental Botany* **2009** 60, 3531–3544.

Hadfield KA, Bennett AB. Polygalacturonases: many genes in search of a function. *Plant Physiology* **1998** 117, 337–343.

Hamilton, A.J., Bouzayen, M., and Grierson, D. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991** 88, 7434–7437.

Hanson, B., May, D. Effect of subsurface drip irrigation on processing tomato yield, water table depth, soil salinity, and profitability. *Agric. Water Manage.* **2004** 68, 1–17.

Harker F.R., Redgwell R.J., Hallett I.C., Murray S.H., Carter G. Texture of fresh fruit. *Horticultural Reviews* **1997** 20, 121–224.

Hartmut K. Lichtenthaler and Alan R. Wellburn. Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. 603rd Meeting Held at the University of Liverpool on 11–13 April **1983**

Haupt-Herting S, Klug K, Fock HP.. A new approach to measure gross CO₂ fluxes in leaves: gross CO₂ assimilation, photorespiration, and mitochondrial respiration in the light in tomato under drought stress. *Plant Physiology* **2001** 126, 388–396.

Hayano-Kanashiro C, Calderòn-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Simpson J.. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PLoS ONE* **2009** 4, e7531.

Hazen SP, Pathan MS, Sanchez A, Baxter I, Dunn M, Estes B, Chang HS, Zhu T, Kreps JA, Nguyen HT. Expression profiling of rice segregating for drought tolerance QTLs using a rice genome array. *Functional and Integrative Genomics* **2005** 5, 104–116.

Herbert V. Introduction of the symposium: prooxidant effect of antioxidant vitamins. *J. Nutr.*, **1996** 126, 1197S-1200S.

Hong SW, Jon JH, Kwak JM, Nam HG.. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **1997** *113*, 1203–1212.

Horemans N, Foyer CH, Asard H: Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends in Plant Science* **2000**, *5*, 263-267.

Huang DQ, Wu WR, Abrams SR, Cutler AJ.. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *Journal of Experimental Botany* **2008** *59*, 2991–3007.

Huguene P., Ramer, s., bntz, M., and Camara, B. Characterization and molecular cloning of a flavoprotein catalyzing the synthesis of phytofluene and ζ -carotene in *Capsicum* chromoplasts. *Eur. J. Biochem.* **1992** *209*, 399-407.

Hunter WN. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J Biol Chem* **2007** *282*, 21573–21577

Jackson LE. Root architecture in cultivated and wild lettuce (*Lactuca* spp.). *Plant Cell Environ* **1995** *18*, 885–894

Jackson LE, Koch GW. The ecophysiology of crops and their wild relatives. In: Jackson LE (ed) *Ecology in Agriculture*. Academic Press, San Diego, **1997**, 3–37

Jimenez A., Hernandez J. A., del Rio L. A., Sevilla F. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *PLANT PHYSIOLOGY* , **1997** *114* (1), 275-284.

Johnson, P.R., and Ecker, J.R. The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu. Rev. Genet.* **1998** *32*, 227–254.

Just Bj. Santos Caf, Fonseca Men, Boitex Ls, Oliozia Bb, Simón Pw. Carotenoids biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor App Genet* **2007** *114*, 693-704

Kahn, T.L., Fender, S.E., Bray, E.A., and O'Connell, M.A. Characterization of expression of drought- and abscisic acidregulated tomato genes in the drought-resistant species *Lycopersicon Pennellii*. *Plant Physiol.* **1993** *103*, 597–605.

Kaloo, G. Breeding for environmental resistance in tomato, in *Genetic Improvement of Tomato*, Ed., Monographs on Theoretical and Applied Genetics, **1991** *14* 153–165.

Kampfenkel K., Van Montagu M., Inze D. Effects of Iron Excess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants (Implications to Oxidative Stress). *Plant Physiology* **1995** *107*, 725-735.

Khachik F., Carvalho L., Bernstein P. S., Muir G. J., Zhao D. Y, e Katz N. B. Chemistry, distribution, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health,” *Experimental Biology and Medicine*, **2002** *227*, no. 10, 845–851.

- Kotikova, Z.; Lachman, J.; Hejtmankova, A.; Hejtmankova, K. Determination of antioxidant activity and antioxidant content in tomato varieties and evaluation of mutual interactions between antioxidants. *LWT—Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1703–1710.
- Lecomte L., Duffe P., Buret M., Servin B., Hospital F., Causse M. Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics* **2004** *109*, 658–668.
- Levy J., Bosin E., Feldman B., Giat Y., Miinste A., Danilenko M., Sharoni Y. Lycopene is a potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr. Cancer*, **1995** *24*, 257-266.
- Li Y, Jones L, McQueen-Mason S. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* **2003** *6*, 603–610.
- Liebhart R, Kellerhals M, Pfammatter W, Jertmini M, Gessler C. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Plant Molecular Biology* **2003** *52*, 511–526.
- Lippman Z. B., Semel Y., Zamir D. An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genetics & Dev.*, **2007** *17*, 545-552.
- Liu J., Cong B., and Tanksley S.D. Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus *fw2.2* controls fruit size. *Plant Physiol.* **2003** *132*, 292–299
- Lopez F., Vansuyt G., Casse-Delbart F., Fourcroy P. Ascorbate peroxidase activity, not the mRNA level, is enhanced in salt-stressed *Raphanus sativus* plants. *Physiologia plantarum*, **1996** *97*, 13-20.
- Lorenz OA, Maynard DN. *Handbook for Vegetable Growers*. J Wiley and Sons, New York **1988**.
- Ludwig AA, Romeis T, Jones JDG. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany* **2004** *55*, 181–188.
- Lynch J. Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* **1995** *109*, 7–13
- Marè C, Mazzucotelli E, Crosatti C, Francia E, Stanca AM, Cattivelli L. Hv-WRKY38: a new transcription factor involved in cold- and drought-response in barley. *Plant Molecular Biology* **2004** *55*, 399–416.
- Martin, B., Nienhuis, J., and King, G. Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science (Washington, D.C.)*, **1989** *243*, 1725–1728.

Martin, B., Tauer, C.G., and Lin, R.K. Carbon isotope discrimination as a tool to improve water-use efficiency in tomato. *Crop Sci.* **1999** 39, 1775–1783.

Matson PA, Parton WJ, Power AG, Swift MJ. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* **1997** 277: 504–509

McQueen-Mason S, Durachko DM, Cosgrove DJ. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell* **1992** 11, 1425–1433.

Maunder, M.J., Holdsworth, M.J., Slater, A., Knapp, J.E., Bird, C.R., Schuch, W., and Grierson, D. Ethylene stimulates accumulation of ripening-related mRNAs in tomatoes. *Plant Cell and Environ.* **1987** 10, 177-184.

Minorsky PV. Achieving the in silico plant: systems biology and the future of plant biological research. *Plant Physiol* **2003** 132, 404-409

Mizoguchi T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Kamada H, Shinozaki K. Two genes that encode ribosomal-protein S6 kinase homologs are induced by cold or salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **1995** 358, 199–204.

Moose S.P., Dudley J.W., and Rocheford T.R. Maize selection passes the century mark: A unique resource for 21st century genomics. *Trends Plant Sci.* **2004** 9, 358–364.

Morris C.E., and Sands D.C. The breeder's dilemma—Yield or nutrition? *Nat. Biotechnol.* **2006** 24, 1078–1080.

Murashige, T., and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962** 15, 473-497.

Nguyen, H.T., Babu, R.C., and Blum, A. Breeding for drought resistance in rice: physiology and molecular genetics considerations. *Crop Sci.* **1997** 37, 1426–1434.

Nicoletti I., De Rossi A., Giovinazzo G., Corradini D. Identification and quantitation of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersion esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *J Agric Food Chem.* **2007** 55, 3304–3311.

Niggeweg R., Kocher T., Gentzel M., Buscaino A., Taipale M., Akhtar A., Wilm, M. A general precursor ion-like scanning mode on quadrupole-TOF instruments compatible with chromatographic separation. *Proteomics* **2006** 6, 41–53.

Nijveldt R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* **2001** 74, 418–425.

Niyogi KK. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **1999** 50, 333–359

Padayatty S. J., Katz, A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J. H., Chen S., Corpe C.,

- Dutta A., Dutta S. K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2003** 22(1):18-35.
- Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochemistry and cell Biology*, **1990** 68, 1166-1173.
- Passioura J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. *Journal of Experimental Botany* **2007** 58, 113–117.
- Pastori, G.M. et al. Leaf vitamin C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signaling. *Plant Cell* **2003** 15, 939–951
- Pecker, I., Chamovitr, D., Linden, H., Sandmann, G., and Hirshberg, J. A single polypeptide catalyzing the conversion of phytoene to ζ -carotene is transcriptionally regulated during tomato fruit ripening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992** 89, 4962-4966.
- Pernice, R.; Parisi, M.; Giordano, I.; Pentangelo, A.; Graziani, G.; Gallo, M.; Fogliano, V.; Ritieni, A. Antioxidants profile of small tomato fruits: Effect of irrigation and industrial process. *Sci. Hortic.* **2010**, 126, 156–163.
- Petersen M, Strack D, Matern U. Biosynthesis of phenylpropanoids and related compounds. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*: **1999** 151–221
- Pietta P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* **2000** 63, 1035–1042.
- Pillay, I., and Beyl, C. Early responses of drought-resistant and -susceptible tomato plants subjected to water stress. *J. Plant Growth Regul.* **1990** 9, 213–219.
- Pourcel L., Routaboul J.M., Cheynier V., Lepiniec L., Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* **2006** 8, 29–36.
- Pratt LH, Liang C, Shah M, et al. Sorghum expressed sequence tags identify signature genes for drought, pathogenesis, and skotomorphogenesis from a milestone set of 16,801 unique transcripts. *Plant Physiology* **2005** 139, 869–884.
- Rabbani MA, Maruyama K, Abe H, Khan MA, Katsura K, Ito Y, Yoshiwara K, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiology* **2003** 133, 1755–1767.
- Raffo A., La Malfa G., Fogliano V., Maiani G., Quaglia, G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lypersicon esculentum* cv. Naomi F1). *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006** 19, 11–19.

Redgwell R.J., Fischer M. Fruit texture, cell wall metabolism and consumer perceptions. In Knee M (Ed.). Fruit quality and its biological basis Oxford Blackwell **2002** 46–88.

Rein D., Schijlen E., Kooistra T., Herbers K., Verschuren L., Hall R., Sonnewald U., Bovy A., Kleemann, R. Transgenic flavonoid tomato intake reduces C-reactive protein in human C-reactive protein transgenic mice more than wild-type tomato. *J. Nutr.* **2006** *136*, 2331–2337.

Renaud S. C., Gueguen R., Schenker J., d’Houtaud A. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, **1998** *9*, 184–188.

Ribaut, J.M., Jiang, C., Gonzalez-de-Leon, D., Edmeades, G.O., and Hoisington, D.A. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* **1997** *94*, 887–896.

Richards, M.A., and Phills, B.R. Evaluation of *Lycopersicon* species for drought tolerance. *HortScience*, **1979** *14*, 121.

Rick C. M. High soluble-solids content in large-fruited tomato lines derived from a wild green-fruited species, *Hilgardia*, **1974** *42*, 493–510.

Rick C. M. S. D. Tanksley. Genetic variation in *Solanum pennellii*: comparison with two other sympatric tomato species. *Plant Systematics and Evolution* **1981** *139*, 11–45.

Rick, C.M. The role of natural hybridization in the derivation of cultivated tomatoes in western South America. *Econ. Bot.* **1958** *12*, 346–367.

Rick, C.M. Potential genetic resources in tomato species: clues from observation in native habitats. *In* Genes, enzymes, and populations. Edited by A.M. Srb. Plenum Press, New York, N.Y. **1973**, 255–269.

Romer S., Fraser P.D., Kiano J.W., Shipton C.A., Misawa N., Schuch W., Bramley P.M. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol* **2000** *18*, 666– 669.

Ronen G., Cohen M., Zamir D., Hirschberg J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is downregulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J* **1999** *17*, 341–351.

Rosati, C. et al. Metabolic engineering of beta-carotene and lycopene content in tomato fruit. *Plant J.* **2000** *24*, 413–420.

Rose JKC, Braam J, Fry SC, Nishitani K. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiology* **2002** *143*, 1421–1435.

Rousseaux M. C., Jones C. M., Adams D., Chetelat R., Bennett A., Powel A. QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theor. Appl. Genet.*, **2005** *111*, 1396-1408

Saccardo F., Crinò P. Orticoltura Italiana: dalle popolazioni agli OGM. *Italus Hortus* **2003** *10* (3): 37-45.

Saliba-Colombani V., Causse M., Langlois D., Philouze J., Buret M. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 1. Mapping QTLs for physical and chemical traits. *Theoretical and Applied Genetics* **2001** *102*, 259–272.

Salvi S., Tuberosa R. To clone or not clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends in Plant Science*, **2005** *10*, 297-304.

Sato, T., and Theologis, A. Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989** *86*, 6621–6625.

Sato P., Udenfriends S. Scurvy-prone animals, including man, monkey and guinea pig do not express the gene for gulonolactone oxidase. *Arch Biochem Biophys*, **1978** *71*, 293-299.

Savouré A., Thorin D., Davey M., Hua X. J., Mauro S., Van Montagu M., Inzé D., Verbruggen N. NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in *Nicotiana plumbaginifolia* L. *Plant, Cell and Environment*, **1999** *22*, 387-396.

Scaltber A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* **2000** *130*, 2073S-2085S.

Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J., Willmitzer L., Zamir D., Fernie A.R. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement, *Nat Biotechnol* **2006** *24*, 447–454.

Serrano-Megias M., Lopez-Nicolas J.M. Application of agglomerative hierarchical clustering to identify consumer tomato preferences: influence of physicochemical and sensory characteristics on consumer response. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006** *86*, 493–499.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* **2001** *13*, 61–72.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* **2002** *31*, 279–292.

Seymour GB, Manning K, Eriksson EM, Popovich AH, King GJ. Genetic identification and genomic organization of factors affecting fruit texture. *Journal of Experimental Botany* **2002** *53*, 2065–2071.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **2007** *58*, 221–227.

Shock, C.C., Feibert, E.B.G., Deficit irrigation of potato. In: Deficit Irrigation Practices. Water reports **2002** *22*, 47–55.

Siddique KHM, Belford RK, Tennant D. Root-shoot ratios of old and modern, tall and semidwarf wheats in a Mediterranean environment. *Plant Soil* **1990** *121*, 89–98

Singleton V.L., Rossi J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965** *16*, 144–158.

Slimestad, R.; Verheul, M. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1255–1270.

Smirnoff, N. The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation. *New Phytol.* **1993**, *125*, 27–58.

Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA: Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **2001**, *52*, 437–467.

Smirnoff N, Wheeler GL: Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **2000** *35*, 291–314.

Snape J.W., Foulkes M.J., Simmonds J., Leverington M., Fish L.J., Wang Y., Ciaravella M. Dissecting gene X environmental effects on wheat yields via QTL and physiological analysis. *Euphytica* **2007** *154*, 401–408.

Snow J, Mills T, Zidar M. Nitrates in ground water, Salinas Valley, California. *Monterey County Flood Control and Water Conservation District*, Salinas, Calif. **1988**.

Song CP, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang PC, Zhu JK. Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* **2005** *17*, 2384–2396.

Spanu, P., Reinhardt, D., and Boller, T. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *EMBO J.* **1991** *10*, 2007–2013.

Stevens, R.; Buret, M.; Garchery, C. C.; Carretero, Y.; Causse, M.. Technique for Rapid, Small-Scale Analysis of Vitamin C Levels in Fruit and Application to a Tomato Mutant Collection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6159–6165.

Sturm, A. and Tang, G.Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends Plant Sci.* **1999** 4, 401–407.

Subudhi, P.K., Rosenow, D.T., and Nguyen, H.T. Quantitative trait loci for the stay green trait in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench): consistency across genetic backgrounds and environments. *Theor. Appl. Genet.* **2000** 101, 733–741.

Szczesniak A.S. Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference* **2002** 13, 215–225.

Talamè V, Ozturk NZ, Bohnert HJ, Tuberosa R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. *Journal of Experimental Botany* **2007** 58, 229–240.

Tanksley SD, Grandillo S, Fulton TM, Zamir D, Eshed Y, Petiard V, Lopez J, Beck-Bunn T. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theor Appl Genet* **1996** 92, 213–224.

Temple N. J. Antioxidants and disease: more questions than answers. *Nutrition Research*, **2000** 20, 449-459.

Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary polyphenolic phytochemicals--promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int J Cancer.* **2007** 120(3), 451-8.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **2001** 98(9):5 116-21.

Valpuesta V., Botella M. A. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathway for an old antioxidant. *TRENDS in Plant Science* **2004** 9(12), 573-577

van der Knaap E., Sanyal A., Jackson S.A., Tanksley S.D. High-Resolution Fine-Mapping and FISH analysis of *sun*, a *Locus* Controlling Tomato Fruit Shape, Reveals a Region of the Tomato Genome Prone to DNA Rearrangements. *Genetics* **2004** 168, 2127–2140.

Vasquez-Robinet C, Mane SP, Ulanov AV, et al.. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany* **2008** 59, 2109–2123.

Verhoeyen M.E., Bovy A., Collins G., Muir S., Robinson S., de Vos C.H.R., Colliver S. Increasing antioxidant levels in tomatoes through modification of the flavonoid biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany* **2002** 53, 2099-2106.

Von Lintig J., Welsch R., Bonk M., Giuliano G., Batschauer A., Kleinig H. Light-dependent regulation of carotenoid biosynthesis occurs at the level of phytoene synthase expression and is mediated by phytochrome in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J* **1997** 12, 625-634.

Vos, J., Haverkort, A.J. Water availability and potato crop performance. In: Vreugdenhil, D., Bradshaw, J., Gebhardt, C., Govers, F., Mackerron, D.K.L., Taylor, M.A., Ross, H.A. (Eds.), *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. Elsevier, **2007** 333–351.

Wagner G., Loewus F. The biosynthesis of (+)-tartaric acid in *Pelargonium crispum*. *Plant Physiology*, **1973** 52, 651-654.

Waldron K.W., Parker M.L., Smith A.C. Plant cell walls and food quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2003** 2, 101–119.

Wang YC, Jiang J, Zhao Xi, Liu GF, Yang CP, Zhan LP. A novel LEA gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. *Plant Science* **2006** 171, 655–662.

Washko P. W., Welch R. W., Dhariwal K. R., Wang Y., Levine M. *Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analysis in biological samples*. *Anal Biochem*, **1992**, 204, 1-14.

Welsch R, Beyer P, Huguency P, Kleinig H, von Lintig J. Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta* **2000** 211, 846–854.

Welsh, B.C., Loeber, R., Stevens, B.R., Stouthamer-Loeber, M., Cohen, M.A., & Farrington, D.P. The costs of juvenile crime in urban areas: A longitudinal perspective. *Youth Violence and Juvenile Justice*, **2008** 6, 3–27.

Werk KS, Ehleringer J. Photosynthetic characteristics of *Lactuca serriola* L. *Plant Cell Environ* **1985** 8, 345–350

Wheeler G. L., Jones M. A., Smirnoff N. The biosynthetic pathway of Vitamin C in higher plants. *Nature*, **1998** 393, 365-369.

Willcox J.K., Catignani G.L., Lazarus S. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2003** 43, 1–18.

Wudiri, B.B., and Henderson, D.W. Effects of water stress on flowering and fruit set in processing tomatoes. *Sci. Hortic.* **1985** 27, 189–198.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Organization of cisacting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends in Plant Science* **2005** 10, 88–94.

Yelle S., Chetelat R.T., Dorais M., Deverna J.W., Bennett A.B. Sink metabolism in tomato fruit. 4. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. *Plant Physiology* **1991** 95, 1026–1035.

Zamir D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* **2001** 2, 983–989.

Zegbe, J.A., Behboudian, M.H., Lang, A., Clothier, B.E. Deficit irrigation and partial rootzone drying maintain fruit dry mass and enhance fruit quality in 'Petopride' processing tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Sci. Hortic.* **2003** *98*, 505–510.

Zhang, J., Zheng, H.G., Aarti, A., Pantuwan, G., Nguyen, T.T., Tripathy, J.N., Sarial, A.K., Robin, S., Babu, R.C., Nguyen, B.D., Sarkarung, S., Blum, A., and Nguyen, H.T. Locating genomic regions associated with components of drought resistance in rice: comparative mapping within and a cross species. *Theor. Appl. Genet.* **2001** *103*, 19–29.

Zhang Y., Stommel J.R. RAPD and AFLP tagging and mapping of Beta (B) and Beta modifier (Mo-B), two genes which influence beta-carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theor Appl Genet* **2000** *100*, 368–375.

Zhu JK. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biol* **2001** *4*, 401-406.

Zushi, K.; Matsuzoe, N. Effect of soil water deficit on vitamin C, sugar, organic acid, amino acid and carotene contents of large-fruited tomatoes. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* **1998**, *67*, 927–933

Tesi di dottorato di Ricerca di: Dott.ssa Adriana Sacco. Genetic Mechanism underlying tomato quality traits.

Ringraziamenti

Ringrazio il prof. L. Frusciante che ha supervisionato le attività del mio progetto di dottorato.

Un ringraziamento particolare al Dott. A. Di Matteo che ha diretto il mio lavoro di tesi e mi aiutato a migliorare le procedure di analisi e sperimentazione.

Ringrazio la prof.ssa A. Barone per la sua disponibilità e i suoi suggerimenti.

Ringrazio il prof. L. Ricciardi, i suoi collaboratori, il Prof. M. Fagnano e il Dott. N. Fiorentino che mi hanno fornito dati e suggerimenti indispensabili per la realizzazione del presente lavoro di tesi.

Ringrazio, inoltre, la coordinatrice del dottorato Prof.ssa M. Rao per la sua disponibilità.

Ringrazio tutto il gruppo Barone che mi è stato vicino e mi ha dato un valido supporto.

Inoltre vorrei esprimere la mia sincera gratitudine alla dott.ssa N. Lombardi per i suoi numerosi consigli durante la ricerca.

Infine, ho desiderio di ringraziare con affetto i miei genitori e mio fratello per il sostegno ed il grande aiuto che mi hanno dato ed in particolare mio marito per essermi stato vicino ogni momento durante questo lavoro di tesi.