

**Identificazione di QTL (*quantitative trait loci*)  
associati alle modifiche dello ionoma di  
pomodoro in linee di introgressione  
omozigoti di *Solanum lycopersicum* x  
*S. pennellii***

**Gianluca Ruotolo**

Dottorato in Agrobiologia e Agrochimica . XXV ciclo  
Indirizzo Miglioramento genetico e Orticoltura  
Università di Napoli Federico II

Dottorando: Gianluca Ruotolo

Relatore: Prof. Edgardo Filippone

Co-relatore: Dott.ssa Margherita-Gabriella  
De Biasi

Coordinatore: Prof. Matteo Lorito



*Al fiore più pregiato che abbia mai incontrato.*

*õ õ una Rosa piena di petali: uno per ogni virtù  
õ .. tenacia, amore, sopportazione,  
silenzio, discrezione, passione õ .  
con le quali ha alleviato  
le conseguenze di questa avventura.*

## INDICE

<b>1. INTRODUZIONE</b>	Pag. 1
1.1 Ionoma e ionomica	Pag. 1
1.2 Biofortificazione e sicurezza alimentare	Pag. 2
1.3 Il pomodoro: diffusione, profilo salutistico, nutrizionale e minerale	Pag.5
1.4 Miglioramento genetico del pomodoro ed utilizzo delle linee di introgressione	Pag. 7
1.5 scopo della tesi	Pag. 8
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	Pag. 10
2.1 Materiali	Pag. 10
2.1.1 <i>Reagenti</i>	Pag. 10
2.1.2 <i>Soluzioni standard</i>	Pag. 10
2.1.3 <i>Materiali certificati</i>	Pag. 10
2.1.4 <i>Materiale vegetale</i>	Pag. 10
2.2 Metodi	Pag. 11
2.2.1 <i>Condizioni di crescita, trattamento e campionamento</i>	Pag. 11
2.2.2 <i>Mineralizzazione dei tessuti fogliari e dei terreni</i>	Pag. 12
2.2.3 <i>Determinazione mediante ICP-MS delle concentrazioni degli elementi</i>	Pag. 13
2.2.4 <i>Analisi statistica</i>	Pag. 15
2.2.5 <i>Identificazione di QTL</i>	Pag. 16
<b>3. RISULTATI</b>	Pag. 17
3.1 Relazione tra gli elementi dello ionoma degli apici caulinari di pomodoro	Pag. 17
3.2. Identificazione di QTL	Pag. 18
3.2.1 <i>QTL identificati in condizioni controllo</i>	Pag. 19
3.2.2 <i>QTL identificati in condizioni di trattamento</i>	Pag. 20
3.3 Identificazione e studio dei QTL per ogni singola IL	Pag. 21
3.3.1 <i>Identificazione di QTL per ogni singola IL in piante controllo</i>	Pag. 21
3.3.2 <i>Identificazione di QTL per ogni singola IL in piante trattate</i>	Pag. 23
3.4 Analisi cluster	Pag. 26

<b>4. DISCUSSIONE</b>	Pag. 29
<b>5. CONCLUSIONI</b>	Pag. 39
<b>6. FIGURE</b>	Pag. 40
<b>7. TABELLE</b>	Pag. 46
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 50

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Ionoma e ionomica

Lo ionoma è definito come l'insieme degli elementi minerali e degli elementi presenti in tracce di un organismo o di un tessuto e ne rappresenta la componente inorganica (Lahner et al., 2003). Questa definizione è derivata da quella di metalloma (Williams 2001), che prendeva in considerazione solo i metalli, includendo nell'accezione di ionoma anche i non metalli e gli elementi in tracce presenti in un organismo o in parti di esso.

La ionomica, lo studio dello ionoma, è la misura quantitativa e simultanea della composizione degli elementi minerali di un organismo o di parte di esso e l'analisi della variazione di tale composizione elementare come risposta a stimoli fisiologici, agli stadi di sviluppo o a modifiche genetiche (Salt et al., 2008).

Così come l'avvento di tecnologie come la gascromatografia combinata con la spettrometria di massa (GC-MS) e la risonanza magnetica nucleare ha permesso l'avanzamento delle conoscenze nel campo della metabolomica, allo stesso modo la spettrometria di massa al plasma (ICP-MS), attraverso l'analisi simultanea di un elevato numero di elementi minerali, presenti anche in traccia, ha consentito un enorme avanzamento delle conoscenze nel campo della nutrizione minerale e nella definizione dell'importanza dell'analisi dello ionoma.

Tali avanzamenti tecnologici sono stati contemporanei ai progressi ottenuti in altri campi quale ad esempio la bioinformatica, che ha affinato sempre più gli strumenti per effettuare analisi *in silico* predittive sia delle localizzazioni sia delle funzioni dei geni, il sequenziamento genomico, la proteomica e la metabolomica così da fornire sempre più un quadro olistico del funzionamento cellulare di un individuo.

Inoltre, lo sviluppo di piattaforme di genotipizzazione high-throughput e le metodologie di mappatura hanno accelerato enormemente anche il processo di identificazione di nuovi loci (QTL) che controllano lo ionoma (Zhao et al., 2007).

Le variazioni del contenuto degli elementi minerali in un organo o nell'intera pianta possono dipendere da molti fattori quali: l'ambiente pedologico, modificato continuamente sia dalla pianta sia da fattori ambientali; la morfologia e la fisiologia della pianta; la capacità di assorbimento traslocazione e accumulo della specie vegetale, legate alla modulazione e regolazione dei trasportatori di membrana; la sintesi e l'accumulo di agenti chelanti, i meccanismi di distribuzione intracellulare degli elementi minerali (Baxter, 2009).

Inoltre molti studi hanno dimostrato che la concentrazione di un elemento minerale in una pianta è influenzata anche dalle interazioni che si determinano tra i diversi nutrienti. Chen e i suoi collaboratori (Chen et al., 2009b) hanno dimostrato che in *L. japonica* sono presenti correlazioni positive tra arsenico, ferro, sodio, zinco e molibdeno, tra magnesio e nichelio e tra manganese, calcio e stronzio. Gli Autori sostengono l'ipotesi che tali correlazioni potrebbero dipendere dalla presenza in *L. japonica* di trasportatori non specifici, capaci di trasportare elementi di natura diversa.

L'analisi dello ionoma di *A. thaliana* ha mostrato correlazioni positive tra manganese, cobalto, zinco e cadmio in condizioni di carenza di ferro e correlazioni positive tra boro, zinco ed arsenico in carenza di piombo (Baxter et al., 2008).

Inoltre studi condotti su popolazioni di linee ricombinanti isogeniche (RIL) hanno evidenziato che differenze nello ionoma si riscontrano sia nel singolo organo o tessuto come risposta al variare delle condizioni di crescita sia tra organi o tessuti diversi sottoposti alle stesse condizioni di crescita, suggerendo ciò la presenza di fattori di controllo dell'accumulo degli elementi tessuto-specifici (Ghandilyan et al., 2009). Tale studio ha inoltre dimostrato la presenza di QTL associati all'accumulo di uno stesso elemento in tessuti diversi e che ciascun elemento minerale è soggetto a meccanismi di controllo diversi che rispondono al variare delle condizioni ambientali.

## **1.2 Biofortificazione e sicurezza alimentare**

Negli scorsi decenni la ricerca nel campo agrario ha avuto come principale obiettivo quello di aumentare la produttività per ettaro delle specie vegetali di interesse per l'alimentazione dell'uomo, ponendo poca attenzione al miglioramento della concentrazione dei nutrienti minerali in esse contenuti. Oggi invece tale obiettivo è diventato predominante su altri perché circa la metà della popolazione mondiale soffre di malnutrizione da micro e macro elementi (White e Broadle, 2009).

La biofortificazione è un processo di arricchimento del contenuto di nutrienti nelle specie coltivate finalizzato alla salute del consumatore (Hirshi, 2009). Essa è ritenuta una soluzione sostenibile per la problematica della malnutrizione, che è diffusa nel mondo in special modo nei paesi in via di sviluppo, poiché altre soluzioni quali ad esempio la diversificazione della dieta oppure l'uso di integratori alimentari appaiono poco praticabili proprio in quei paesi, per ragioni tecnologiche ed economiche (Zhu et al., 2007). In

quest'ottica quindi la biofortificazione minerale appare la soluzione più semplice tra quelle disponibili (Welch e Graham, 2004; Mayer et al., 2008).

Il primo successo raggiunto attraverso l'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica è stato il Golden Rice+, un riso fortificato per l'accumulo di provitamina A (beta-carotene) (Ye et al., 2000). Negli anni successivi si sono ottenuti altri alimenti biofortificati caratterizzati dall'accumulo ad esempio di vitamina E (Van Eenennaam et al., 2003), di acido folico (Bekaert et al., 2008) e di calcio (Morris et al., 2008) nelle parti edibili delle specie di interesse. In particolare Morris ha ottenuto piante di carote ingegnerizzate per l'accumulo di calcio, le quali accumulavano il doppio del contenuto medio di calcio di una cultivar di carote commerciale.

Recentemente molta attenzione è volta all'ottenimento di alimenti fortificati attraverso il miglioramento delle loro caratteristiche nutrizionali, guardando anche all'accumulo di elementi minerali, quali Se, I, Zn, implicati in numerosi processi fisiologici tra cui il rallentamento dell'invecchiamento cellulare (White e Broadley, 2009; Grusak M A., 1999).

Tali ricerche orientate alla selezione di genotipi e/o cultivar portatrici di caratteri di interesse per la biofortificazione, hanno tenuto in poco conto la possibilità che esse potessero accumulare anche sostanze tossiche, non solo per la salute della pianta ma anche e soprattutto per la salute dell'uomo. Infatti, il rapido aumento dell'industrializzazione negli ultimi decenni ha determinato il rilascio nell'ambiente di notevoli quantità di sostanze tossiche (Zhuang et al., 2007), come ad esempio 22.000 t di cadmio, 939.000 t di rame, 783.000 t di piombo e 1.350.000 t di zinco (Singh et al., 2003). L'inquinamento del suolo è per certi versi più preoccupante di quello dell'aria e dell'acqua fondamentalmente perché diversi elementi minerali tossici, tra cui i metalli pesanti persistono nel suolo per tempi più lunghi che negli altri compartimenti della biosfera (Lasat, 2002).

Dei 92 elementi naturali presenti nella crosta terrestre solo 18 (macronutrienti e micronutrienti) sono essenziali per le piante come risulta dalla tabella riportata nella seguente pagina.

Altri 3 elementi, silicio, nichel e alluminio sono considerati elementi benefici, solo per alcune specie e sono presenti nelle piante in tracce (Pilon-Smits et al., 2009); altre ricerche hanno riguardato altri elementi, alcune dei quali ritenuti potenzialmente benefici soprattutto per l'uomo, tra cui l'argento, il cesio, il cromo, il fluoro, lo iodio, il lantanio, il rubidio, lo stagno, lo stronzio, il titanio, il vanadio ed il tungsteno. Inoltre le piante sono in grado di accumulare anche elementi minerali che non svolgono alcuna funzione nella

pianta stessa, ma che al contrario sono notevolmente tossici sia per la pianta sia per la maggior parte degli organismi viventi tra cui l'uomo (Fraga, 2005).

	<b>Elemento</b>	<b>Forma nella quale l'elemento è assorbito</b>	<b>Concentrazione nella pianta (% di peso secco)</b>
<b>Macronutrienti</b>	Carbonio	CO <sub>2</sub>	44
	Ossigeno	H <sub>2</sub> O o O <sub>2</sub>	44
	Idrogeno	H <sub>2</sub> O	6
	Azoto	NO <sub>3</sub> o NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1-4
	Potassio	K <sup>+</sup>	0,5-6
	Calcio	Ca <sup>++</sup>	0,2-3,5
	Fosforo	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> o HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,1-0,8
	Magnesio	Mg <sup>++</sup>	0,1-0,8
	Zolfo	SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,05-1
<b>micronutrienti</b>	Ferro	Fe <sup>++</sup> o Fe <sup>+++</sup>	25-300 ppm
	Cloro	Cl <sup>-</sup>	100-10.000 ppm
	Rame	Cu <sup>++</sup>	4-30 ppm
	Manganese	Mn <sup>++</sup>	15-800 ppm
	Zinco	Zn <sup>++</sup>	15-100 ppm
	Molibdeno	MoO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	0,1-5 ppm
	Boro	BO <sub>3</sub> <sup>-</sup> o B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>-</sup>	5-75 ppm
<b>Elementi essenziali per alcune specie</b>	Cobalto	Co <sup>++</sup>	Tracce
	Sodio	Na <sup>+</sup>	Tracce
<b>Elementi benefici per alcune specie</b>	Silicio		Tracce
	Nichel		Tracce
	Alluminio		Tracce

Tra questi, l'arsenico, lo stagno, il berillio, il cadmio, il cromo, il cobalto, il piombo, il nichel ed il vanadio sono considerati carcinogeni per l'uomo dall'Agenzia Internazionale della Ricerca sul Cancro (IARC) (Beyersmann e Hartwing, 2008). Inoltre anche elementi

essenziali, quale ferro, rame, zinco, cobalto e manganese, che sono accumulati da tutte le specie vegetali, possono diventare tossici se assorbiti in eccesso (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998).

Tra i metalli pesanti, per lo più elementi di transizione che possiedono densità superiore a 5 g/cm<sup>3</sup> (Holleman e Wiberg, 1985), che sono presenti nei suoli inquinati e che le piante accumulano utilizzando meccanismi molecolari preposti all'assorbimento di altri elementi, i più tossici per le piante, anche a bassissima concentrazione intracellulare, sono piombo, cadmio e mercurio. Al contrario, diverse specie vegetali sono in grado di vivere in suoli molto inquinati e di assorbire ed accumulare concentrazioni elevate di metalli tossici come ad esempio *Thlaspi geosingense* ed *Euphorbia helenae*, che accumulano quantità elevate di nichel, mentre altre specie come *Thlaspi caerulescens* e *Astragalus bisulcatus* accumulano concentrazioni elevate rispettivamente di zinco e selenio (Guerinot e Salt 2001). Le tecniche utilizzate per l'ottenimento di genotipi recanti caratteri utili per la biofortificazione alimentare, sia mediante ingegneria genetica sia mediante miglioramento genetico classico o assistito con marcatori molecolari, devono tener ben presente che i meccanismi molecolari per l'accumulo negli organi eduli di elementi minerali importanti per la biofortificazione sono gli stessi che possono portare all'accumulo di elementi tossici negli stessi organi. Ciò rende il controllo della quantità e qualità degli elementi accumulati anche in tracce negli organi eduli dei nuovi genotipi una necessità assoluta per la sicurezza alimentare.

### **1.3 Il pomodoro: diffusione, profilo salutistico, nutrizionale e minerale**

Oggi il pomodoro è diffuso in tutto il mondo sia per il consumo fresco sia per la trasformazione industriale e comprende una grande quantità di varietà ed ecotipi coltivati in diverse aree geografiche (Taylor, 1986). Il pomodoro riveste un ruolo importante nell'economia agricola mondiale, occupando una superficie di circa di cinque milioni di ettari con una produzione di circa 160 milioni di tonnellate con una resa media di circa 28 tonnellate per ettaro. Principale produttore è la Cina, con circa 48 milioni di tonnellate, seguita, a distanza, dall'India, con 16 milioni di tonnellate. Il paese maggior produttore di pomodoro, nell'area mediterranea, è la Turchia con circa 11 milioni di tonnellate l'anno; in Italia esso è coltivato su una su una superficie di 122.852 ha, pari al 3% della superficie mondiale, con una produzione di circa 6 milioni di tonnellate l'anno (FAOSTAT 2011).

Oltre che per l'aspetto economico, il pomodoro è considerato un eccellente prodotto anche dal punto di vista nutrizionale (Beutner et al., 2001; Gahler et al., 2003; Rosales et al., 2006; Dorais et al., 2008). Infatti, la bacca di pomodoro è ricca di vitamine (A, C, B1, B2, K, P, PP) sali minerali (K, Ca, Na, P) carotenoidi, flavonoidi (licopene), fibra vegetale (Beecher, 1997) ed è riportato che esso coadiuva e talvolta migliora alcuni processi fisiologici dell'organismo umano (Kushi et al., 1995). Per quanto riguarda la sua composizione chimica, il pomodoro contiene acqua (94%), proteine (1%), grassi (0,2%), carboidrati (2,8%), questi ultimi rappresentati esclusivamente da zuccheri solubili quali glucosio, fruttosio e rafinosio e saccarosio in tracce. L'elevato rapporto tra contenuto di acqua e livello di zuccheri immediatamente disponibili rende il pomodoro consigliato anche in diete ipocaloriche. Il pomodoro aiuta ad eliminare l'eccesso di proteine che può essere provocata da una alimentazione troppo ricca di carni e facilita la digestione dei cibi che contengono fecole ed amidi, come pasta, riso, patate, inoltre esso, grazie al ricco contenuto di acido malico ed acido lattico, è un eccellente attivatore della motilità gastrica e risolve, in molti casi, problemi relativi ad una digestione lenta o ad una scarsa acidità gastrica. Inoltre il pomodoro contiene istamina, solanina e tomatina (licopersicina); quest'ultima, presente soprattutto in foglie e in frutti acerbi è una molecola ad azione battericida, che aiuta ad abbassare i livelli di colesterolo presente negli altri alimenti. Malgrado sia ben dimostrata l'attività tossica e battericida della tomatina nei confronti di numerosi predatori erbivori vertebrati ed invertebrati, recenti studi hanno dimostrato l'inibizione della proliferazione di cellule tumorali del colon e del fegato in tessuti umani (Lee et al., 2004).

Il pomodoro inoltre è ricco di vitamine solubili, in particolare vitamina A, C e vitamine del gruppo B importanti per la salute dell'uomo. Il consumo di un pomodoro di medie dimensioni riesce a coprire il 40% del fabbisogno giornaliero di vitamina C e il 15% del fabbisogno giornaliero di vitamina A in forma di  $\beta$ -carotene (610 g/100 g). Un importante ruolo antiossidante è svolto, oltre che dal  $\beta$ -carotene, anche da altri pigmenti quali i carotenoidi (in grado di conferire principalmente colorazione gialla, arancione, rossa) le antocianine (in grado di conferire una colorazione rossa, che vira al rosa) e le antoxantine, più conosciute come flavonoidi (che colorano in bianco-giallo).

Per quanto riguarda la sua composizione minerale la bacca del pomodoro contiene potassio (297 mg/ per 100 g), utile contro la ritenzione di liquidi e l'ipertensione; fosforo (25 mg/ per 100 g), che è una componente essenziale di molti processi enzimatici e riveste un ruolo fondamentale nella contrazione muscolare; calcio (9 mg/100 g), fondamentale per la

composizione di ossa e denti e per la prevenzione della osteoporosi; ferro (0,3mg/100g), zinco (0,11mg/100g) e selenio (2,3 g/100g) che aiutano a combattere i segni dell'invecchiamento cutaneo. Le fibre, presenti per il 2% sono concentrate nella buccia e nei semi; nella polpa, invece, sono presenti acidi organici, soprattutto citrico e malico, che possono esercitare un'azione alcalinizzante, essenziale per neutralizzare i composti acidi che si formano nel nostro organismo; infatti, a dispetto del suo sapore acido, questo ortaggio ha un buon equilibrio acido-basico, e per questo favorisce l'alcalinizzazione dell'organismo. Inoltre, grazie al suo sapore acidulo, il pomodoro stimola le secrezioni dell'apparato digerente e favorisce i processi assimilatori.

#### **1.4 Miglioramento genetico del pomodoro ed utilizzo delle linee di introgressione**

Il miglioramento delle cultivar di pomodoro è stato fondamentale per la specie umana fin dall'inizio della sua coltivazione nel XVI secolo in Europa. I caratteri su cui, nel passato, si è focalizzato il miglioramento genetico, sono stati soprattutto habitus di crescita e le caratteristiche della bacca (taglia, forma, colore e morfologia). La variabilità delle dimensioni del frutto è, ancora oggi, un importante carattere del pomodoro che è passato nel tempo da dimensioni ridotte, che hanno assolto il compito della propagazione del seme alle bacche di grandi dimensioni delle moderne cultivar ottenute dal lavoro sapiente dei *breeder* e che sono largamente impiegate per il consumo alimentare (Bai e Lindhout, 2007).

Poiché una cultivar di pomodoro ha un turnover commerciale di circa 5 anni, il miglioramento genetico è di fondamentale importanza per le aziende produttrici di semi. La selezione di linee parentali che presentano caratteri utili e sono utilizzate per produrre semi F<sub>1</sub> rappresenta un compito fondamentale per tali aziende e poiché la variabilità genetica nelle cultivar di pomodoro è stimata essere inferiore al 5% di quella delle specie selvatiche di origine (Miller e Tanksley, 1990) il pool genetico di tali specie selvatiche rappresenta una ricca fonte di caratteri utili.

Sia il miglioramento genetico classico sia quello ottenuto mediante l'utilizzo della genetica molecolare e delle biotecnologie si è focalizzato sui caratteri correlati alla resistenza alle malattie, al contenuto di carotenoidi (Liu et al., 2003), alla tolleranza alla salinità (Frary et al., 2011), all'aumento dei livelli di antiossidanti (Ronen et al., 1999, Zhang e Stommel 2000), all'incremento della produttività, ma poco interesse è stato rivolto al miglioramento delle qualità nutrizionali correlate all'incremento della concentrazione di elementi minerali

e micronutrienti nella pianta in generale e nel frutto. Tale aspetto oggi è diventato sempre più oggetto di ricerca considerando che circa la metà della popolazione mondiale soffre di malnutrizione da carenza di macro e microelementi quali ad esempio ferro, zinco e selenio (White e Broadley, 2005).

Il miglioramento genetico di cultivar di pomodoro di interesse economico è spesso basato sull'introggressione di geni utili da specie selvatiche donatrici (Fooland, 2007). Le successive operazioni di selezione delle progenie derivanti da tali reincroci non garantiscono, se non specificamente studiati, l'eliminazione di geni non desiderati e dei caratteri fenotipici da essi dipendenti. Tra i caratteri non soggetti a controllo nel processo di selezione sono quelli riguardanti l'assorbimento degli elementi dal suolo, la loro traslocazione e il loro accumulo negli organi eduli, quei caratteri che definiscono lo ionoma di una pianta. Le linee di introggressione di pomodoro (IL) sono una popolazione di linee quasi isogeniche sviluppate in seguito all'incrocio tra una specie selvatica e una cultivar coltivata seguito da una serie successiva di reincroci. Ogni linea originata da tale procedura porta in omozigosi un singolo segmento di cromosoma della specie selvatica e tali linee offrono una copertura completa del genoma del pomodoro (Zamir, 2001, 2006; Tanksley et al., 1996). Una popolazione di IL completa ricostituisce quindi completamente il genoma della specie donatore (selvatica). Di conseguenza, queste popolazioni sono molto utili per identificare e stabilizzare QTL, perché ogni differenza fenotipica tra ciascuna IL e il genitore ricorrente (coltivato) è attribuita esclusivamente a uno o più geni del genitore donatore (selvatico) presenti sul segmento cromosomico introgresso nel genoma della specie coltivata (Lippman et al., 2007). Tali linee di introggressione sono state, infatti, usate spesso per l'identificazione di QTL associati a caratteri importanti dal punto di vista agronomico e commerciale del pomodoro.

### **1.5 Scopo della tesi**

*Solanum pennellii* è una specie selvatica di pomodoro cross-compatibile con le specie coltivate e che spesso è utilizzata nei programmi di miglioramento genetico del pomodoro al fine di introdurre in esso caratteri utili (Zamir, 2001). Presso il Dipartimento di Scienze del Suolo della Pianta e dell'Ambiente (DiSSPA) dell'Università di Napoli Federico II, dove in parte si è svolto questo lavoro di dottorato, sono disponibili i semi delle 76 linee di introggressione della specie selvatica *S. pennellii* nella cultivar M82 di *S. lycopersicum* (Eshed e Zamir, 1995). Fino ad oggi non ci sono dati pubblicati sull'influenza del genoma di

*S. pennellii* sullo ionoma di cultivar di pomodoro derivanti dall'incrocio con essa. Pertanto, queste IL sono un materiale adatto per identificare QTL associati alle modifiche dello ionoma di pomodoro in risposta all'introgressione e al trattamento con elementi minerali tossici per la pianta o per l'uomo.

Il presente lavoro di dottorato si inserisce nel progetto di ricerca denominato "GenoPOM" finanziato dal MIUR e in particolare nella tematica riguardante l'analisi strutturale e funzionale del genoma di pomodoro per l'identificazione di geni per caratteristiche di qualità e di tolleranza a stress biotici e abiotici per l'ottenimento di alimenti con migliorate caratteristiche organolettiche ed elevato valore salutistico e nutritivo. L'obiettivo di questo lavoro di dottorato è stato valutare la variabilità presente in pomodoro per nutrienti associati alla salute, quali elementi minerali essenziali e non attraverso la definizione delle mappe ionomiche del pomodoro ed identificare i QTL associati allo ionoma del pomodoro. Per raggiungere tali obiettivi, in questo lavoro di dottorato è stato studiato il contributo delle introgressioni di *S. pennellii* nella specie coltivata *S. lycopersicum* cv. M82 nell'accumulo di elementi minerali negli apici caulinari di una collezione di IL, allevate in condizione controllate e in presenza o assenza di elementi tossici. Tale studio ha permesso di identificare IL recanti QTL associati alla fortificazione alimentare e alla sicurezza alimentare del pomodoro.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Materiali

#### 2.1.1 Reagenti

L'acido nitrico, 65% (m/v), l'acido cloridrico, 37% (m/v) e l'acido fluoridrico al 40% (m/v) usati sono prodotti da E. Merck, Darmstadt, FRG.

L'acqua ad alta purezza è stata ottenuta facendo passare l'acqua distillata attraverso un sistema deionizzante Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore, Bedford, MA, Stati Uniti).

#### 2.1.2 Soluzioni standard

Le soluzioni standard sono state preparate a partire da 10 mg/l di standard di calibrazione ICP-MS n. 1, 2, 3, 4 (PE Pure, Perkin-Elmer) per diluizione con acqua contenente la stessa quantità di acido nitrico dei campioni.

#### 2.1.3 Materiali certificati

I materiali certificati utilizzati sono stati foglie di orchidea NBS 1571, foglie di tabacco CTA-OTL NIST e foglie di pomodoro NIST 1573.

#### 2.1.4 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato nel presente lavoro di ricerca include 59 linee di introgressione (IL) per l'esperimento sulle piante controllo e 60 per l'esperimento sulle piante trattate, prodotte tramite reintrogressione tra la specie coltivata *Solanum lycopersicum*, cultivar M82, e la specie selvatica *Solanum pennellii* LA0716 (Eshed e Zamir, 1995). A queste è stata aggiunta la stessa specie coltivata, parentale delle IL, *Solanum lycopersicum*, cultivar M82.

I semi delle IL e quelli della cultivar M82 erano già presenti presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e dell'Ambiente (DISSPAPA) dell'Università Federico II di Napoli e provenivano dal Tomato Genetics Resource Center (TGRC) USA.

## 2.2 Metodi

### 2.2.1 Condizioni di crescita, trattamento e campionamento.

Quaranta semi del genotipo controllo cv. M82 e 20 semi di ciascuna IL sono stati seminati ciascuno in 37.5 grammi di terriccio sterile commerciale (Floragard miscela speciale) inumidito, posto in contenitori alveolari di polistirolo e posti in serra.

Dopo 15 giorni dall'emergenza, le plantule sono state irrigate ogni settimana con 0.7 ml con soluzione di Hoagland (0.25X) (Epstein, 1972); tale irrigazione era mantenuta fino al termine della sperimentazione per le piante controllo e per le piante trattate. Dopo 30 giorni dall'emergenza una metà delle piante germinate (20 piante per la cv. M82 e 10 piante per ciascuna IL) sono state irrigate per due volte dopo 7 giorni, tra la prima e la seconda irrigazione, con una soluzione contenente arsenico, cadmio, cromo, rame, nichel, piombo, e zinco in forma combinata come riportato in calce.

<b>Elemento</b>	<b>Sale</b>	<b>Concentrazione nella soluzione madre (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentrazione finale (g l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Quantità di elementi aggiunti al terreno (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Arsenico</b>	AsHNa <sub>2</sub> O <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,00	0,024	0,90
<b>Cadmio</b>	CdSO <sub>4</sub>	25,66	1,124	41,96
<b>Cromo</b>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	10,00	0,354	13,22
<b>Nichel</b>	Ni SO <sub>4</sub> *6 H <sub>2</sub> O	2,00	0,045	1,68
<b>Piombo</b>	Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	10,00	0,626	23,30
<b>Rame</b>	Cu SO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	10,00	0,255	9,52
<b>Zinco</b>	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	28,75	0,654	24,42

Quindici giorni dopo l'inizio del trattamento, l'apice vegetativo di quattro piante controllo e quattro piante trattate per ciascuna IL e per la cv. M82, selezionate in base ad uniformità di altezza, diametro del fusto, numero di palchi fogliari e uniformità di stadio di sviluppo, sono state prelevate, poste in azoto liquido e conservate a -80°C, per essere successivamente analizzate.

### **2.2.2 Mineralizzazione dei tessuti fogliari e dei terreni.**

Al fine di mineralizzare i tessuti vegetali campionati, essi sono stati posti in stufa a 50°C per 72 ore fino alla stabilizzazione del peso.

Ciascun campione, pari a 200 mg di peso secco, è stato digerito e mineralizzato. La mineralizzazione dei tessuti fogliari si basa sulla digestione con acido concentrato a caldo, in recipienti chiusi posti in un Microway allo scopo di portare in soluzione gli elementi associati al particolato o presenti in forma colloidale e/o organica.

A tale scopo sono stati usati HNO<sub>3</sub> al 65 % di grado ultrapuro e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %. La presenza di questi due ossidanti ha determinato una prima disgregazione della matrice organica dei nostri campioni mentre la completa disgregazione e solubilizzazione dei tessuti si è ottenuta utilizzando un sistema a microonde ad alta pressione ed alta temperatura. Per i nostri tessuti si è deciso di utilizzare l'acido nitrico, poiché tale acido è meno forte di altri e garantisce un recupero completo degli elementi presenti in soluzione. È stato usato un forno a microonde della Multiwave Anton Paar dotato di sei vasi in teflon posti su un rotore che permette il monitoraggio in continuo della pressione e temperatura di ciascuno di essi.

La digestione dei tessuti fogliari è stata ottenuta aggiungendo, ad ogni campione omogeneizzato ed inserito nel vaso:

- 4 ml di HNO<sub>3</sub> al 65% super puro;
- 1ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La digestione è stata condotta applicando il seguente programma:

Energia	Tempo
Da 100 W a 500 W	5 min.
800 W	15 min.
0 W	15 min.

Alla fine del ciclo di mineralizzazione i campioni digeriti sono stati diluiti cinque volte portandoli a 25 ml con acqua Milli-Q e in seguito sono stati analizzati mediante ICP-MS.

La verifica sperimentalmente dell'affidabilità del metodo di digestione e le prestazioni dello strumento (ICP-MS) sono state eseguite quotidianamente applicando la stessa procedura di mineralizzazione e di analisi all'ICP ai materiali vegetali certificati da noi utilizzati: foglie di orchidea NBS 1571, foglie di Tabacco CTA-OTL e foglie di pomodoro NIST 1573. Per

ogni ciclo di mineralizzazione è stato eseguito un bianco analitico nel quale il campione è stato sostituito da un'identica quantità di acqua (0,2 ml) MilliQ (18M $\Omega$ ).

Alla fine di ciascun ciclo di mineralizzazione seguiva una fase di lavaggio dei vasi. A ciascun vaso sono stati aggiunti 5 ml di HCl 6N e il vaso è stato sottoposto ad un primo ciclo nel microne applicando una temperatura di 1.000W per 20 minuti e ad un secondo ciclo di 10 minuti a 0 W.

### **2.2.3 Determinazione mediante ICP-MS delle concentrazioni degli elementi**

La determinazione della concentrazione degli elementi presenti nei tessuti campionati e mineralizzati è stata effettuata mediante ICP-MS. Per le analisi è stato utilizzato uno spettrometro di massa accoppiato induttivamente a plasma (ICP-MS) ELAN 6000 della Perkin Elmer equipaggiato di nebulizzatore cross-flow e pompa peristaltica GILon per l'introduzione del campione (Elan 6000, ICP-MS hardware guide 1997).

Lo strumento è dotato di auto-campionatore modello AS 90 (Perkin-Elmer) e di diversi sistemi di introduzione del campione, che permettono di analizzare matrici allo stato liquido, gassoso e solido.

Tale strumento per la sua elevata sensibilità e precisione permette di utilizzare quantità di campione piccole (0,2 g) e di determinare simultaneamente macro/micro-nutrienti ed elementi presenti in traccia.

L'ottimizzazione operativa dell'ICP-MS è stata eseguita regolando il flusso di nebulizzazione ed eseguendo l'allineamento dello spettrometro di massa rispetto alla torcia per ottenere la massima produzione degli ioni M<sup>+</sup> e la minima produzione degli ioni M<sup>++</sup> e MO<sup>x+</sup> della torcia. Lo strumento è stato quotidianamente monitorato utilizzando una soluzione certificata dalla Perkin Elmer di 10  $\mu$ g/l di bario, cesio, rame, indio, uranio, rodio, magnesio e piombo in HNO<sub>3</sub> all'1%.

Tutte le analisi sono state eseguite e riferite a curve di calibrazione costruite con concentrazioni fisse e crescenti degli elementi considerati. Le prestazioni dello strumento sono state validate applicando le stesse procedure sperimentali ai materiali vegetali.

La concentrazione di sodio, magnesio, calcio, stronzio, bario, vanadio, cromo, molibdeno, manganese, ferro, cobalto, nichel, rame, zinco, cadmio, alluminio, piombo ed arsenico sono state determinate mediante ICP-MS e le concentrazioni sono state riferite al peso secco dei tessuti campionati. I risultati sono stati riportati eseguendo il seguente calcolo analitico:

$$\text{Concentrazione dello ione (mg/Kg)} = (A \cdot B) \times C/P$$

dove:

A = concentrazione ( $\text{mg l}^{-1}$ ) dell'elemento nella soluzione digerita;

B = concentrazione ( $\text{mg l}^{-1}$ ) dell'elemento nella soluzione digerita nel bianco analitico;

C = fattore di diluizione (l).

P = peso del campione (Kg)

La tecnica analitica per la determinazione della concentrazione degli elementi mediante la spettrometria di massa di ioni generati con accoppiamento induttivo a plasma, comporta l'introduzione del campione, opportunamente nebulizzato, in un flusso di argon altamente ionizzato ad elevatissime temperature ( $7.000-8.000^\circ \text{C}$ ). Tali temperature di esercizio sono raggiunte mediante l'induzione elettromagnetica generata da un campo di radiofrequenze.

Il trasferimento di energia dal gas ionizzato (plasma) al campione determina la desolvatazione, l'atomizzazione e la ionizzazione degli elementi. Gli ioni uscenti dal plasma sono convogliati attraverso due coni, il *sampler* e lo *skimmer*, che selezionano gli ioni, in un fascio ionico che, focalizzato da un sistema di lenti, arriva nell'analizzatore di massa costituito da un quadrupolo. Qui le specie ioniche sono separate in base al rapporto massa/carica (Montaser et al., 1998).

L'introduzione del campione oltre che mediante nebulizzatore avviene anche mediante sistemi alternativi come l'elettrotermica vaporization (ETV) o il *flow injection* (FIA). L'ETV è una tecnica di elettrovaporizzazione che consiste nel sottoporre il campione ad un programma termico opportunamente scelto, tale da permettere la separazione della matrice dagli analiti. Questo tipo di intervento permette di ridurre la soppressione del segnale, causata dalla presenza di sali nella matrice, senza ricorrere a diluizioni del campione che renderebbero ancora più difficile la determinazione delle bassissime concentrazioni in cui generalmente sono presenti gli elementi (Chapple e Byrne, 1996). Il FIA è un sistema di iniezione in flusso mediante il quale possono essere operate in linea una serie di pretrattamenti del campione prima del suo arrivo al nebulizzatore.

I vantaggi di tale strumento, rispetto alle più tradizionali tecniche spettroscopiche, sono: la possibilità di analizzare quantitativamente più elementi simultaneamente; più bassi limiti di rilevabilità (DL o LOD o *detection limits*); la possibilità di compiere analisi isotopiche; necessari ridotti volumi di campione; la semplicità di letture degli spettri risultanti. Gli

svantaggi nascono dal fatto che solo alcuni elementi sono monoisotopici, mentre la maggior parte presentano da due a sei isotopi, producendo possibili interferenze.

Comunemente le interferenze si dividono in spettrali e non spettrali (Rodushkin et al., 1998). Le interferenze spettrali sono causate da ioni molecolari e atomici che hanno la stessa massa nominale dell'analita di interesse, mentre le interferenze non spettrali sono spesso riferite alla natura della matrice (deposizione di sali o ossidi di matrice all'interfaccia) che può portare ad una soppressione o ad un aumento del segnale di risposta dello strumento.

Tutte le mineralizzazioni e le analisi all'ICP-MS sono state svolte presso i laboratori del centro ricerche ENEA di Portici, diretti dal Dott. A. Salluzzo.

#### **2.2.4 Analisi statistica**

I valori di concentrazione degli elementi ottenuti mediante ICP-MS sono stati raggruppati in base al genotipo (4 campioni per ciascun genotipo e 18 elementi per ogni campione).

Tali dati sono stati analizzati statisticamente mediante tre analisi statistiche: il t-test di Student, l'analisi di correlazione multipla (MC) e l'analisi cluster gerarchica (HCA).

Il t-test di Student è stato eseguito utilizzando Excel 2007 (Microsoft®).

L'analisi di correlazione multipla (MC) e l'analisi cluster gerarchica (HCA) sono state eseguite utilizzando il pacchetto software XLSTAT (Addinsoft SARLTM).

Il t-test di Student è stato impiegato per confrontare la media della concentrazione di ciascun elemento trovato in ciascuna IL con la media della concentrazione dello stesso elemento nella linea parentale controllo cv. M82. La soglia di significatività è stata posta a  $p < 0,05$ .

L'analisi di correlazione multipla è stata eseguita usando come dati di ingresso le medie di tutti i genotipi oggetto di analisi (ossia tutte le IL e la cv. M82) per tutti gli elementi analizzati. È stata così ottenuta una matrice di correlazione a doppio ingresso.

L'analisi cluster gerarchica è stata compiuta usando come valori di ingresso la differenza tra la media delle concentrazioni di ogni elemento quantificato in ciascuna IL e la concentrazione media dello stesso elemento nella cv. M82. Il risultato è stato un dendrogramma costruito con il metodo di Ward e le differenze tra i nodi sono state espresse in unità di dissimilarità con il metodo della distanza Euclidea.

### **2.2.5 Identificazione di QTL**

Per ogni elemento analizzato, l'effetto di ciascuna introgressione è stato espresso come differenza percentuale tra la media di quell'elemento in quella IL e la media dello stesso elemento nella cv. M82 ( $\text{media IL} - \text{media cv. M82} / \text{media cv. M82} \times 100$ ).

Il confronto di ogni IL con la cv. M82, che come detto costituisce il background genetico della stessa IL, consente di attribuire le differenze che si evidenziano tra le concentrazioni degli elementi nelle IL al contributo dell'introgressione. Ad esempio, un valore del 50% in una IL per un determinato elemento indica che l'introgressione ha causato un aumento del 50% della concentrazione di tale elemento rispetto alla cv. M82.

Sono stati scelti come valori identificativi della presenza di un QTL associato allo ionoma nel tratto di cromosoma di *S. pennelii* introgresso nella cultivar M82 solo i valori che hanno presentato una variazione percentuale rispetto alla cv. M82 superiore al 30% in valore assoluto e che nello stesso tempo erano risultati statisticamente significativi a  $p < 0,05$  al t-test di Student utilizzato per il confronto tra le medie delle concentrazioni degli elementi nelle IL e quella della cv. M82, come riportato da Rousseaux et al. (2005) e Frary et al. (2011) in studi analoghi di identificazione di QTL nella popolazione di IL.

### 3. RISULTATI

Le concentrazioni dei 18 elementi sono state determinate mediante analisi all'ICP-MS applicata agli apici caulinari di piante di pomodoro sia della cultivar M82 sia per le 59 linee di introgressione (IL, *S. lycopersicum* cv. M82 x *S. pennellii*). I dati provenienti da questa analisi sono stati elaborati al fine di studiare la correlazione tra concentrazione di tali elementi negli apici caulinari e il contributo dell'introgressione di porzioni del genoma *S. pennellii* LA0716 in *S. lycopersicum*.

#### 3.1 Relazione tra gli elementi dello ionoma degli apici caulinari di pomodoro

La relazione tra gli elementi dello ionoma degli apici caulinari di pomodoro è stata studiata eseguendo un'analisi di correlazione multipla tra la concentrazione di ogni elemento presente negli apici sia delle IL sia nella cv. M82 in piante allevate in condizioni controllate di coltura. La matrice di correlazione risultante è riportata in tabella 1 dove sono visibili i valori significativi (Pearson) a  $p < 0,05$ . Gli elementi studiati sono stati ordinati in base alla loro appartenenza ai gruppi chimici definiti dalla tavola di Mendeleev ed in base alle loro proprietà fisiologiche. Questo ordine è stato utilizzato in tutte le figure e le tabelle di questa tesi.

Su un totale di 71 correlazioni significative 12 sono risultate negative, mentre le altre 59 correlazioni sono risultate di segno positivo. Gli unici elementi che mostrano correlazioni negative significative con tutti gli altri sono il cobalto ed il piombo mentre tra loro mostrano una correlazione positiva. È possibile notare come il ferro sia al primo posto come numero di correlazioni con gli altri elementi, con 14 correlazioni sulle 17 possibili; solo sodio, magnesio ed alluminio non hanno mostrato alcuna significativa correlazione con la variazione di concentrazione di questo elemento. Inoltre il ferro mostra il maggior numero di correlazioni positive rispetto agli altri elementi, con 12 sulle 14 risultanti dall'analisi. Il rame e l'alluminio invece sono quelli che risultano avere meno correlazioni mostrando solo 3 correlazioni, rispettivamente con molibdeno, ferro, zinco e vanadio, cobalto, nichel. Per quanto concerne le sole correlazioni positive il vanadio è secondo solo al ferro con 11 elementi correlati; al terzo posto si collocano calcio, stronzio, e manganese, ciascuno con dieci elementi correlati con essi. È anche interessante notare come sodio, magnesio, bario, molibdeno, nichel, rame, zinco e cadmio abbiano mostrato solo correlazioni positive con gli altri elementi.

La stessa analisi di correlazione con le stesse metodologie statistiche è stata eseguita per le piante irrigate con una soluzione contenente metalli pesanti come descritto in Materiali e Metodi. Il risultato di tale analisi è riportato in tabella 2.

Per quanto concerne questa analisi è possibile notare che, a differenza di quanto osservato per le piante controllo, non esiste alcuna correlazione negativa tra le concentrazioni degli elementi. Il numero di correlazioni totali è di 87, risultato maggiore rispetto all'analisi delle piante in condizioni di controllo, dove ne sono state osservate 71. Inoltre è possibile notare che il piombo ed il cobalto, che in assenza di irrigazione con metalli pesanti erano risultati correlati positivamente tra loro e negativamente con tutti gli altri elementi, in questa analisi non hanno mostrato una correlazione statisticamente significativa tra loro e presentano solo una correlazione positiva significativa con altri elementi: il piombo con il cromo ed il cobalto con il molibdeno. L'alluminio non risulta correlato con alcun elemento, mentre è aumentato notevolmente il numero di correlazioni di rame, zinco, cadmio e molibdeno rispetto sempre alle condizioni di crescita in assenza di irrigazione con soluzione contenente metalli pesanti. Il ferro invece conferma la sua posizione al primo posto per numero di correlazioni con gli altri elementi, con 14 correlazioni ma lo stesso numero di correlazioni è in queste condizioni mostrato anche dal calcio e dallo stronzio.

### **3.2. Identificazione di QTL**

L'introggressione di porzioni di genoma di *S. pennellii* in quello di *S. lycopersicum* ha prodotto nelle nostre condizioni sperimentali, sia per le piante controllo sia per le piante trattate, diverse variazioni significative nello ionoma dell'apice caulinare di tutte le linee di introggressione, se confrontato allo ionoma della linea parentale cv. M82.

In tabella 3 ed in tabella 4 sono riportati, per ogni singolo elemento saggiato e per tutte le IL, i valori espressi come percentuale di differenza tra la media della concentrazione dell'elemento nella IL e la media della concentrazione dell'elemento nella cv. M82, applicando la formula riportata in Materiali e Metodi.

Al fine di comprendere se per ogni elemento la differenza tra la concentrazione media rilevata nelle singole IL e quella osservata nella cv. M82 fosse significativamente differente è stato applicato il test statistico t-Student per  $p < 0.05$ . Tale analisi statistica è stata eseguita sia per le piante controllo sia per le piante che sono state sottoposte ad irrigazione con soluzione contenente i metalli pesanti.

Le differenze tra le concentrazioni dello stesso elemento tra la cv. M82 ed ogni IL superiori al 30% in valore assoluto e risultate statisticamente significative a  $p < 0.05$  sono state considerate come identificative della presenza di un QTL nel tratto di cromosoma di *S. pennelii* introgresso nella cv. M82, in accordo alla definizione di QTL espressa da Rousseaux et al. (2005). Nelle tabelle 3 e 4 sono riportati quindi in carattere grassetto i QTL identificati come sopra descritto.

### **3.2.1 QTL identificati in condizioni controllo**

Per quanto concerne le piante controllo, nella figura 1 è riportata la distribuzione dei QTL per ciascun elemento saggiato (pannello A) ed anche la frequenza di IL aventi lo stesso numero di QTL (pannello B). Nel pannello A di tale figura è possibile notare che per tutti gli elementi saggiati sono stati trovati QTL che influenzano la variazione della concentrazione nell'apice dell'elemento in esame.

In generale, è interessante notare che la maggior parte dei QTL rilevati sono associati ad una diminuzione della concentrazione dell'elemento nell'apice caulinare. Non vi è alcun elemento, infatti, per il quale sono stati trovati QTL associati solo all'aumento della concentrazione dell'elemento saggiato, mentre solo il sodio, il ferro ed il cadmio hanno mostrato esclusivamente QTL associati ad una diminuzione della loro concentrazione.

Il più alto numero di QTL associati ad una diminuzione di concentrazione degli elementi negli apici è stato trovato in due elementi: il sodio (55 QTL) ed il rame (45 QTL). D'altra parte solo il manganese con 19 QTL ed il cobalto con 33 QTL sono risultati gli elementi per i quali è stato riscontrato il maggior numero di QTL associato all'aumento della loro concentrazione.

Dal pannello B della figura 1 si evidenzia che se da un lato non è stata osservata alcuna IL per la quale non sia stato trovato almeno un QTL associato alla variazione della concentrazione di un elemento, con un numero minimo di QTL pari a 3, dall'altro non vi è alcuna IL per cui sono stati rilevati QTL associati alla variazione di tutti gli elementi saggiati. Dalla stessa figura 1B si evince pure che il numero più frequente di QTL osservati in una IL è stato di 8 sui 18 possibili: infatti, per ben 10 IL sono associati 8 QTL. Infine, il numero di QTL più elevato presente nella stessa IL è stato di 15, carattere mostrato da una sola IL.

### **3.2.2 QTL identificati in condizioni di trattamento**

Nella figura 2 sono riportati, espressi con le stesse modalità grafiche delle piante controllo, i risultati per le piante trattate. Dal pannello A è possibile notare che anche per le piante trattate, così come lo è stato per le piante controllo, la maggior parte dei QTL trovati nel nostro studio sono associati ad una diminuzione della concentrazione degli elementi negli apici caulinari delle IL ma la differenza tra esse è certamente inferiore a quella che è stata rilevata nel caso delle piante controllo. Infatti, nelle piante controllo il numero totale di QTL associati ad un aumento della concentrazione degli elementi è risultato di 109 sul totale di 491 QTL rilevati (22%) mentre nelle piante trattate la proporzione è quasi raddoppiata, raggiungendo il 41%, per la presenza di 215 QTL associati ad un aumento della concentrazione degli elementi sul totale di 530. Un'ulteriore differenza con le piante controllo riguarda il cromo: nelle piante trattate sono stati trovati solo QTL associati all'aumento della sua concentrazione (fig. 2 pannello A) mentre non è stato rilevato alcun elemento nelle piante controllo per il quale siano stati identificati QTL associati solo all'aumento della sua concentrazione.

Le piante trattate hanno mostrato QTL associati solo alla diminuzione della concentrazione negli apici caulinari per tutti gli elementi del II Gruppo saggiati (magnesio, calcio, stronzio, bario) e per il molibdeno, mentre per le piante controllo solo tre elementi, cioè sodio, ferro e cadmio, hanno mostrato lo stesso comportamento.

Per gli elementi quali sodio, vanadio, ferro, rame, alluminio è stata rilevata un'inversione di tendenza tra le piante controllo e le trattate: infatti, per questi elementi le piante controllo hanno mostrato la maggior parte di QTL, se non la loro totalità, associati alla diminuzione delle loro concentrazioni mentre nelle piante trattate è stato rilevato il fenomeno contrario, ossia la presenza della maggior parte dei QTL associati all'aumento di concentrazione. Differentemente, per cobalto ed arsenico nelle piante controllo sono stati osservati la maggior parte dei QTL associati ad un aumento della concentrazione, mentre nelle piante trattate per i suddetti elementi la maggior parte dei QTL sono risultati essere associati alla diminuzione delle loro concentrazioni.

Nel pannello B della figura 2 è stata riportata la frequenza di IL trattate aventi lo stesso numero di QTL. Anche per le piante trattate non è stata osservata alcuna IL per la quale non sia stato rilevato almeno un QTL associato con la variazione della concentrazione di un elemento ed anche in questo caso, come nelle piante controllo, il numero minimo di QTL presenti in una IL è 3, come pure quasi invariato è risultato il numero massimo di QTL

trovati nella stessa IL, pari a 14 anziché di 15 e la frequenza media di QTL rilevati per singola IL, pari ad 8 QTL sui 18 possibili associabili agli elementi saggiati.

### **3.3 Identificazione e studio dei QTL per ogni singola IL**

Nelle figure 3 e 4, rispettivamente per le piante controllo e trattate, sono riportate, in ordine di cromosoma, le IL: per ognuna di esse sono riportati in rosso i QTL associati con un aumento della concentrazione di uno specifico elemento; viceversa, le caselle colorate in blu quelli associati con una diminuzione della concentrazione di uno specifico elemento. Ancora una volta, gli elementi sono stati ordinati in base alle loro proprietà chimiche e fisiologiche, come già spiegato in precedenza.

#### **3.3.1 Identificazione di QTL per ogni singola IL in piante controllo**

Per quanto concerne le piante controllo (figura 3) la maggior parte dei QTL osservati mostrano essere associati ad una diminuzione concentrazione degli elementi negli apici, tranne che per cobalto, manganese, cromo ed arsenico in cui la maggior parte dei QTL sono risultati associati all'aumento della concentrazione rispetto alla cv. M82.

Il numero più basso di QTL è stato osservato nella linea 10-2, infatti in essa sono stati individuati solo tre QTL tutti associati all'aumento della concentrazione di manganese, cobalto ed arsenico rispetto alla cv. M82. Tale IL è anche l'unica delle 59 studiate ad avere solo QTL che si riferiscono all'aumento della concentrazione degli elementi, mentre sono state trovate 8 IL che possiedono QTL relativi alla sola diminuzione della concentrazione e non hanno alcun QTL positivo. Il numero più alto di QTL invece è stato osservato nella IL 3-5 dove ne sono stati individuati 15.

L'elemento che ha mostrato il numero minore di QTL è stato il molibdeno con sole 8 IL su 59 in cui erano presenti QTL; inoltre, solo quello individuato nella IL 9-1-2 è risultato associato ad un aumento di concentrazione del 44,3% rispetto al cv. M82, mentre gli altri sette individuati in altrettante IL sono risultati associati alla diminuzione della concentrazione rispetto alla cv. M82.

L'elemento che ha mostrato il numero più elevato di QTL è stato il sodio, con 55 IL su 59, tutti per altro relativi alla diminuzione di concentrazione; solo le IL 4-3-2, 10-2, 11-1 e 12-2 hanno mostrato un valori di concentrazione non statisticamente diversi dal parentale ricorrente.

Un comportamento analogo a quello del sodio è stato osservato per il cadmio, in cui sono stati coinvolti 34 QTL sempre tutti associati con la diminuzione della concentrazione dell'elemento. Inoltre per questo elemento le introgressioni relative ai cromosomi 5, 9, e 10 non mostrano avere alcuna influenza sulla concentrazione.

Anche il rame ha mostrato per lo più QTL legati ad una diminuzione della concentrazione degli elementi rispetto alla cv. M82, tranne due QTL, associati alle IL 9-1-2 e 12-1-1, che hanno mostrato appunto un aumento della concentrazione rispettivamente di +289,7% e +47,9%. L'alluminio è il quarto elemento che ha mostrato diversi QTL connessi alla riduzione di concentrazione, tranne che per le IL 1-1-3 e 1-4, che hanno mostrato un comportamento inverso con un aumento di concentrazione rispetto alla cv. M82 rispettivamente del 76,5% e del 204,2%. Inoltre, la maggior parte delle introgressioni appartenenti ai cromosomi 7, 10, e 11 non hanno mostrato avere alcun effetto sulla concentrazione dell'elemento rispetto alla cv. M82.

Per il ferro, così come per il sodio ed il cadmio, sono stati identificati QTL associati esclusivamente alla diminuzione della loro concentrazione negli apici caulinari rispetto alla cv. M82, anche se il numero dei QTL a loro associati è risultato decisamente inferiore a quelli sopra riportati. Essi sono risultati localizzati per lo più sui cromosomi 4 e 6, mentre tutte le introgressioni coinvolgenti i cromosomi 9 e 12 non hanno mostrato influenzarne la concentrazione.

Per il magnesio tutti i QTL individuati sono risultati associati ad una diminuzione di concentrazione dell'elemento tranne quello identificato sulla IL 4-3-2, che è risultato essere associato ad un incremento pari a +48,2% della concentrazione.

Per quanto riguarda il bario, è facile notare che tutte le IL appartenenti al cromosoma 8 hanno evidenziato QTL associati con una diminuzione di concentrazione dell'elemento.

Le IL afferenti al cromosoma 9, oltre che a quelle afferenti al cromosoma 8, sono risultate associate ad una diminuzione della concentrazione anche per il vanadio. Inoltre, per quest'ultimo elemento, solo tre QTL, precisamente uno individuato sulla IL 1-4 (+72,0%) e due sul cromosoma 12 (IL 12-1, +60,8%; IL 12-1-1, +135,1%), sono stati associati ad un aumento della concentrazione dell'elemento.

Il calcio e lo stronzio hanno mostrato un comportamento simile al bario per quanto riguarda le IL appartenenti al cromosoma 4.

Cromo, manganese, cobalto ed arsenico hanno mostrato più QTL associati con un aumento della concentrazione del metallo di quelli associati con una sua diminuzione, invertendo la tendenza generale di tutti gli altri elementi (Figura 3). I QTL associati ad un

aumento di cromo e manganese sono stati osservati nelle IL afferenti ai cromosomi 2 e 12. Quelle afferenti a quest'ultimo cromosoma inoltre hanno mostrato QTL relativi ad un aumento della concentrazione anche dello zinco. Inoltre, per quanto concerne il manganese, i QTL associati ad un aumento della sua concentrazione sono stati individuati anche sulle IL afferenti ai cromosomi 9, 10 e 11.

Per quanto concerne infine il cobalto, i QTL associati con l'aumento della concentrazione sono stati individuati su quasi tutti i cromosomi al di fuori del cromosoma 12.

In riferimento al piombo tutte le introgressioni afferenti al cromosoma 1 e la maggior parte di quelle afferenti ai cromosomi 5 e 10 non hanno modificato la concentrazione rispetto alla cv. M82. Invece, i QTL relativi all'aumento della concentrazione di questo elemento sono stati trovati prevalentemente sulle IL appartenenti al cromosoma 4, sulla IL 3-5 e sulla IL 6-4.

Infine è da sottolineare che alcune IL hanno mostrato valori di concentrazione molto differenti rispetto alla linea parentale cv. M82, maggiori di 3 volte le deviazioni standard calcolata sulla media di tutte le concentrazioni per quell'elemento. Tali valori, per altro tutti positivi, sono stati trovati per le seguenti linee: IL 1-1-3 per il nichel (+334,4%), 1-4 per l'alluminio (+204,2%), 3-5 per il cobalto (724,0%) ed il piombo (+ 204,5%), 9-1-2 per il rame (+289,7%), 12-1-1 per il vanadio (+135,1%) e lo zinco (+211,4%). In queste IL, tranne per la IL 3-5, le suddette variazioni di concentrazione degli elementi non hanno influenzato il numero di QTL riguardanti gli altri elementi. La IL 3-5 ha invece mostrato il più alto numero di QTL suggerendo che l'aumento notevole e contemporaneo del contenuto di cobalto e piombo ha modificato fortemente l'ionoma degli apici caulinari del pomodoro in confronto alla cv. M82..

### **3.3.2 Identificazione di QTL per ogni singola IL in piante trattate**

Anche per quanto concerne le piante trattate (figura 4) la maggior parte dei QTL individuati in questo studio sono relativi ad una diminuzione delle concentrazioni degli elementi negli apici. A differenza delle piante controllo però qui è possibile notare che per ben 8 elementi, quali sodio, vanadio, cromo, manganese, ferro, rame, alluminio e piombo, la maggior parte dei QTL sono risultati associati all'aumento della loro concentrazione, mentre nel caso delle piante controllo ciò è stato rilevato solo per il cobalto, il manganese, il cromo e l'arsenico.

Il numero medio di QTL per pianta non ha subito particolari variazioni a seguito del trattamento: è risultato di 8,3 per le piante controllo (491 su 59 piante studiate) e di 8,8 per le piante trattate (530 su 60). Anche il numero minimo di QTL individuati per IL è risultato identico sia per le piante controllo sia per le piante trattate, pari a 3, benché per le prime abbia riguardato la IL 10.2 mentre per le seconde la IL 12-4-1; inoltre, sono stati coinvolti differenti elementi.

La IL 3-5 ha mostrato il numero più alto di QTL sia nell'esperimento di controllo sia nel trattato, con 15 e 14 QTL rispettivamente.

Nelle piante trattate sono state individuate 4 IL (5-2, 9-3-2, 10-2-2 e 12-1-1) che hanno mostrato solo QTL associati ad aumenti della concentrazione degli elementi e 2 IL (4-3-2 e 7-1) per le quali sono risultati QTL associati alla diminuzione della concentrazione degli elementi.

L'elemento con il numero più basso di QTL associati è risultato il ferro con soli 7 QTL mentre quelli con il numero di QTL associati più elevato sono risultati il calcio ed il cromo, entrambi con 51 QTL. La differenza tra di essi sta nel fatto che il calcio ha mostrato solo QTL associati alla diminuzione della concentrazione degli elementi mentre il cromo solo con l'aumento.

Altri elementi che hanno mostrato la stessa peculiarità del calcio sono risultati il magnesio, lo stronzio, il bario ed il molibdeno tutti con QTL associati alla diminuzione della concentrazione dell'elemento, mentre il cromo è stato l'unico elemento per il quale tutti i QTL identificati sono apparsi associati all'aumento della concentrazione dell'elemento. Le introgressioni riguardanti i cromosomi 10, 11 e 12 sembrano non avere avuto influenza sulla concentrazione del magnesio negli apici, mentre per lo stronzio ed il bario ciò è stato rilevato principalmente per le introgressioni dei cromosomi 5, 8 e 11; per il calcio invece la dispersione dei QTL, tutti associati alla diminuzione della concentrazione dell'elemento, è risultata diffusa sulle IL afferenti a tutti i cromosomi.

Gli elementi per i quali il cambiamento tra piante controllo e piante trattate è stato più evidente sono sodio, cobalto, rame, alluminio e arsenico. Infatti, il sodio, il rame e l'alluminio, mentre nelle piante controllo hanno mostrato che la totalità o la quasi totalità dei QTL erano associati alla diminuzione dell'elemento, nelle piante trattate è stata evidenziata un'inversione netta con la quasi totalità dei QTL associati all'aumento della concentrazione dell'elemento. Al contrario per l'arsenico e per il cobalto nelle piante controllo si assiste alla maggioranza dei QTL associati con l'aumento della concentrazione

dell'elemento viceversa nelle piante trattate la maggior parte dei QTL risultano associati alla diminuzione della concentrazione dell'elemento negli apici caulinari.

Per il sodio le IL afferenti al cromosoma 5 hanno mostrato di non incidere in alcun modo sulla variazione di concentrazione dell'elemento negli apici. Inoltre per questo elemento è possibile notare che quasi la totalità delle IL riguardanti i cromosomi 10, 11 e 12 hanno evidenziato la presenza di QTL associati all'aumento della concentrazione dell'elemento.

Per quanto concerne il cobalto i QTL sono stati identificati sulle IL relative a tutti i cromosomi ma si può notare che gli unici QTL associati all'aumento di questo elemento sono presenti solo sulle IL relative al cromosoma 5.

I QTL riguardanti la variazione della concentrazione del rame sono tutti di tipo positivo tranne uno relativo alla IL 6-4. Inoltre per questo elemento si può notare che le IL relative al cromosoma 1 non influiscono sulla variazione della sua concentrazione negli apici caulinari.

Per l'alluminio invece tutte le IL relative ai cromosomi 3, 10 e 12 e la quasi totalità di quelle relative ai cromosomi 2 e 9 non hanno mostrato variazioni significative di concentrazione del metallo negli apici mentre per le IL relative agli altri cromosomi si evidenzia una quasi totalità di QTL associati con l'aumento della concentrazione (figura 4).

Per quanto concerne il piombo anch'esso ha mostrato un numero elevato di QTL associati all'aumento della concentrazione negli apici caulinari e solo le IL relative al cromosoma 12 non mostrano di influenzare la variazione della concentrazione di questo elemento.

Per lo zinco invece le introgressioni del genoma selvatico che hanno mostrato di non influenzare la variazione della sua concentrazione negli apici di pomodoro sono quelle relative ai cromosomi 6 ed 8.

Per quanto concerne il molibdeno ed il manganese è facile notare che le IL afferenti ai primi 6 cromosomi non hanno avuto influenza sulla variazione di concentrazione del metallo non mostrando, se non in rari casi, alcun QTL. Per il molibdeno ciò vale anche per quasi tutte le IL afferenti ai cromosomi 9 e 12. Per il ferro questa particolarità si estende addirittura a tutte le IL afferenti a tutti i cromosomi tranne rare eccezioni, in cui si evidenziano i soli 7 QTL trovati associati con la variazione della concentrazione di questo metallo. Inoltre è interessante notare che le ultime due IL del cromosoma 11 (11-3 e 11-4-1) e/o le prime due del cromosoma 12 (12-1 e 12-1-1) mostrano tutte QTL associati con l'aumento di sodio, vanadio, cromo, nichelio, rame, cadmio, alluminio, piombo ed arsenico, cosa non rilevata nelle piante controllo.

Infine, come per le piante controllo, l'analisi ionomica delle piante trattate che alcuni valori di differenza di concentrazione rispetto alla linea parentale sono risultati maggiori di 3 volte le deviazioni standard calcolata sulla media di tutte le concentrazioni per quell'elemento. Tali valori, anche per le piante trattate risultati tutti positivi, sono stati trovati per le seguenti linee: IL 2-3 per il cromo (+2.507,1%), il nichel (+356,0%) ed il rame (+334,0%); IL 5-2 per il cromo (+1.919,0%); IL 11-4-1 per cadmio (+378,4%). In queste linee, tranne che per la IL 5-2, le suddette variazioni di concentrazione degli elementi hanno influenzato il numero di QTL che coinvolgono gli elementi rimanenti.

### 3.4 Analisi cluster

Al fine di individuare differenze tra le IL sia nelle piante controllo sia in quelle trattate, è stata eseguita l'analisi cluster utilizzando come valori di ingresso le differenze di concentrazione media di ogni singolo elemento tra le IL e la cv. M82. I dendrogrammi risultanti sono stati costruiti con il metodo di Ward e le differenze tra i nodi sono state espresse con il coefficiente di dissimilarità con il metodo della distanza Euclidea. Nella figura 5 è riportato il dendrogramma (a sinistra) e le IL ordinate in base ad esso (a destra) per le piante controllo. Nella figura 6 è riportato il dendrogramma (a sinistra) e le IL ordinate in base ad esso (a destra) per le piante trattate. In entrambe le figure, le linee nere inspessite mettono in evidenza ciascun cluster.

Per quanto concerne le piante controllo il taglio nel dendrogramma è stato fissato dal software a 70 unità di dissimilarità, ottenendo così quattro gruppi (figura 5). In tale dendrogramma le IL relative allo stesso cromosoma sono risultate disperse in tutti i cluster, tranne le IL relative ai cromosomi 1 e 8 che sono risultate raggruppate in un unico cluster, rispettivamente il terzo ed il primo. Per il terzo cluster inoltre è facile notare che esso contiene solo le IL relative al cromosoma 1.

Partendo dall'alto, il primo cluster è rappresentativo per la presenza di IL aventi QTL associati alla diminuzione di contenuto rispetto alla cv. M82 per il vanadio, rame, zinco e cadmio ed all'aumento per il cobalto. Sempre in questo primo cluster inoltre vi sono anche tutti i QTL connessi alla diminuzione della concentrazione per il manganese. In questo cluster si nota inoltre che le uniche IL a mostrare QTL associati all'aumento dell'arsenico sono la 4-2 e la 7-2 mentre tutte le alte IL che hanno tale peculiarità sono state raggruppate nel secondo cluster. Inoltre sempre nel primo cluster sono presenti la IL 4-1 e

la IL 2-2 che hanno mostrato QTL associati all'aumento della concentrazione del cromo mentre le alte IL con tale peculiarità sono raggruppate nel secondo e nel quarto cluster.

Nel secondo cluster sono state raggruppate le IL che mostrano diminuzioni di concentrazione minori di sodio rispetto alla cv. M82. In tale cluster sono presenti anche le IL che hanno mostrato QTL associati con l'aumento della concentrazione dell'arsenico e del manganese. In questo raggruppamento inoltre è risultata presente la IL 12-1-1 che ha mostrato QTL associati all'aumento anche di stronzio, vanadio, cromo, rame, zinco e arsenico ma che non ha mostrato QTL associati alla variazione della concentrazione del manganese. Il valore dello stronzio di questa IL è risultato il più alto valore positivo tra tutte le IL esaminate (tabella 4). Insieme con la IL 4-3-2, anch'essa presente in questo cluster, la IL 12-1-4 ha mostrato il maggior numero di QTL legati ad un aumento della concentrazione degli elementi rispetto al cv M82. La IL 4-3-2 ha mostrato QTL associati ad un aumento di magnesio, calcio, bario, manganese, cobalto, cadmio ed arsenico. Riguardo il magnesio, calcio e bario, i valori di concentrazione sono risultati i più alti registrati rispetto alla cv. M82.

Tutte le linee di introgressione che coinvolgono il cromosoma 1 sono state raggruppate nel terzo cluster. In queste IL le differenze di concentrazione rispetto alla cv. M82 per quanto concerne stronzio, cromo, molibdeno, piombo ed arsenico non sono risultate significative. Le IL 1-1-3 e 1-4 hanno mostrato avere QTL associati ad un forte aumento della concentrazione di alluminio; tali IL sono le uniche che hanno mostrato un accumulo di questo elemento. La IL 1-4 ha anche mostrato QTL associati alle differenze di concentrazione positive per vanadio e manganese rispetto alla cv. M82.

Dei 4 cluster formatisi l'ultimo è quello che ha mostrato la minore omogeneità tra le IL che lo compongono. Tuttavia, sulla base del dendrogramma riportato sul lato (figura 6), è possibile dividere il quarto cluster in due sub-cluster, il primo comprendente le IL dalla 9-1-2 alla 9-3-2 ed il secondo comprendente le IL dalla 2-3 alla 12-4-1. Il primo sub-cluster è caratterizzato dalla presenza di IL aventi QTL associati alla riduzione di magnesio e vanadio e ad un aumento della concentrazione di cobalto. Il secondo sub-cluster invece raggruppa le IL che mostrano QTL associati ad un aumento di manganese e ad una diminuzione del cadmio.

Per quanto concerne le piante trattate, il taglio nel dendrogramma è stato fissato dal software a 95 unità di dissimilarità, ottenendo così tre gruppi (figura 6).

In tale dendrogramma le IL relative allo stesso cromosoma risultano disperse in tutti e 3 cluster, tranne le IL relative ai cromosomi 1 e 6 che sono raggruppate tutte nel primo

cluster. Per quanto concerne il secondo cluster è interessante notare che esso è formato solo da due linee, IL 2-3 e IL 5-2.

A differenza dell'analisi eseguita per le piante controllo, i risultati di questa analisi cluster hanno restituito un quadro con differenze tra i cluster molto meno marcate. Infatti, si nota che le linee, seppur afferenti a diversi cluster, hanno mostrato le stesse caratteristiche quindi risulta difficoltoso trovare le peculiarità caratterizzanti ogni singolo cluster.

Partendo dall'alto, il primo cluster è caratterizzato dalla presenza di IL aventi QTL associati alla diminuzione di contenuto rispetto alla cv. M82 degli elementi appartenenti al II Gruppo cioè magnesio, calcio, bario e stronzio, anche se tali diminuzioni per questi elementi sono presenti anche nelle IL del terzo cluster ma con una frequenza minore. Inoltre, nel primo cluster sono presenti anche le IL che mostrano una diminuzione di concentrazione per cobalto, nichel, zinco, cadmio ed arsenico. In questo cluster è possibile notare la presenza delle IL la cui variazione di contenuto rispetto alla cv. M82 per il ferro risultano non significative.

La prima IL del primo cluster è la 3-5: essa, così come per l'esperimento di controllo, è quella che ha mostrato il numero più elevato di QTL tra tutte le IL saggiate.

La IL 2-3 e la IL 5-2 hanno caratterizzato il secondo cluster, in quanto non hanno mostrato QTL per arsenico, alluminio, stronzio, magnesio e bario,, mentre hanno mostrato QTL associati all'aumento di concentrazione per nichel, rame, zinco, cadmio e piombo. Inoltre queste due IL sono, come già citato nel paragrafo precedente, quelle che hanno mostrato valori di differenza di concentrazione rispetto alla linea parentale ricorrente maggiori di 3 volte le deviazioni standard calcolata sulla media di tutti i valori per quell'elemento. Per la IL 2-3 ciò è avvenuto per cromo, nichel e rame mentre per la IL 5-2 il fenomeno si è manifestato per cromo e cadmio.

Il terzo cluster è stato caratterizzato dalla presenza di IL con QTL tutti associati all'aumento delle concentrazioni di manganese, zinco e vanadio. In esso sono raggruppate anche le IL che hanno mostrato QTL associati a variazioni positive di concentrazione per quanto riguarda il ferro e la quasi totalità delle IL che mostrano QTL associati all'accumulo di arsenico e cadmio.

E' quindi possibile dire che mentre il primo cluster ha raccolto le IL recanti QTL associati ad una diminuzione della concentrazione di metalli negli apici caulinari, il terzo ha raccolto invece le IL che nelle condizioni di trattamento compiute hanno evidenziato la presenza di QTL associati ad un aumento della concentrazione degli elementi, in particolare dei metalli pesanti (figura 6).

#### 4. DISCUSSIONE

L'attività di ricerca svolta per questo lavoro di dottorato ha riguardato lo studio dello ionoma del pomodoro per l'identificazione di QTL associati alla variazione dello ionoma in risposta alle condizioni di crescita, in assenza di dati su questo aspetto presenti in letteratura. A tal fine è stata utilizzata un'intera popolazione di linee di introgressione della specie selvatica *Solanum pennellii* nella varietà coltivata *S. lycopersicum* cv. M82 (IL) ottenute da Eshed e Zamir nel 1995. In ciascuna IL è presente in omozigosi una singola regione cromosomica della specie selvatica introgressa nel genoma della varietà coltivata. Quindi tutte le IL sono identiche alla specie coltivata in tutto il genoma ad eccezione del singolo tratto cromosomico introgresso dalla specie selvatica. Ciò ha consentito di associare le variazioni fenotipiche dell'omeostasi degli elementi minerali, lo ionoma, riscontrate tra ciascuna IL e la cv. M82, alla presenza della regione cromosomica derivata dal genoma della specie selvatica. L'utilizzo delle IL permette di identificare QTL in maniera più affidabile (Zamir, 2001; Fooland, 2007) rispetto all'utilizzo di popolazioni che segregano contemporaneamente per più cromosomi o porzioni di cromosoma sparsi in tutto il genoma, dove loci indipendenti possono mascherare l'espressione del fenotipo influenzandosi reciprocamente a causa delle possibili interazioni epistatiche. Questa popolazione di IL è stata oggetto di molti studi fenotipici, fisiologici, agronomici e molecolari. Tali studi hanno permesso di identificare QTL associati a caratteri legati alla loro morfologia e alla produttività (Lippman et al., 2007), alla colorazione dei frutti (Liu et al., 2003), alle concentrazioni di metaboliti (Causse et al., 2004; Fridman et al., 2004; Baxter et al., 2005; Schauer et al., 2006), alle caratteristiche dei metaboliti volatili (Tieman et al., 2006) ed alla presenza di antiossidanti (Rousseaux et al., 2005), ma non sono presenti in letteratura dati relativi allo ionoma. La comprensione delle variazioni, in risposta alle condizioni di crescita, dell'accumulo dei nutrienti minerali nei diversi tessuti delle piante di pomodoro è fondamentale sia per la comprensione della complessità dello ionoma del pomodoro sia per le possibili applicazioni nel campo del miglioramento genetico assistito con marcatori molecolari per l'ottenimento di pomodori fortificati per la salute dell'uomo ma anche per evitare di introgredire caratteri di assorbimento dal terreno di elementi nocivi per la salute dell'uomo, soprattutto se accumulati in concentrazioni elevate.

In questo lavoro è stato caratterizzato lo ionoma degli apici caulinari di pomodoro assumendo il ruolo di sink dominante che tali tessuti hanno durante lo sviluppo della pianta fino alla fruttificazione (Puig e Pennarubia 2009). Lo strumento utilizzato per

misurare le concentrazioni degli elementi minerali è stata la spettrometria di massa, con l'impiego di un ICP-MS. I dati sono stati in seguito soggetti ad analisi statistica e il confronto tra ciascuna IL e la cv. M82 ha permesso di identificare i QTL associati all'incremento e/o al decremento delle concentrazioni degli elementi minerali negli apici caulinari.

I processi di assorbimento, traslocazione e accumulo degli elementi minerali dipendono strettamente dalla azione di congiunta di numerose proteine di trasporto la cui azione è regolata da una ampia serie di geni che sottendono al loro controllo anche attraverso l'espressione di proteine regolatrici (Clemens 2001, Baxter et al., 2009b; Chao et al., 2011). Pertanto, l'identificazione di QTL associati alle variazioni delle concentrazioni degli elementi nelle foglie, negli apici o in altri tessuti può indicare la presenza di tratti genici importanti per la regolazione di ciascuno dei suddetti processi (Pilon et al., 2009).

I nostri risultati mostrano, in entrambe le sperimentazioni effettuate in assenza o presenza di metalli pesanti in concentrazione non letale nella soluzione di irrigazione delle piante, che i QTL associati alle variazioni delle concentrazioni degli elementi studiati negli apici sono dispersi su tutti i cromosomi; ciò suggerisce che più geni sottendono al controllo dello ionoma.

Inoltre, sono stati identificati numerosi QTL associati alla variazione di più elementi, suggerendo che più QTL potrebbero essere presenti sullo stesso tratto cromosomico introgresso o che lo stesso QTL possa avere effetti pleiotropici, influenzando aspetti multipli dello ionoma essendo coinvolto nell'omeostasi di più elementi. La presenza di QTL per uno stesso elemento su cromosomi diversi e l'associazione di un unico QTL alla variazione di più elementi minerali sono stati recentemente riportati per ferro, potassio e zinco in *Zea mays* (Quin et al., 2012).

Tutte le analisi di correlazione multipla eseguite sui dati di concentrazione degli elementi, sia del controllo sia del trattato, hanno messo in luce un elevato numero di correlazioni significative tra gli elementi oggetto di analisi. Tale analisi ha mostrato che molti elementi, sia essi essenziali sia tossici per la salute umana, sono fortemente correlati tra di loro. Questo è il risultato che alcuni elementi sono strutturalmente molto simili tra loro e spesso utilizzano gli stessi meccanismi di trasporto per il loro assorbimento, trasporto e accumulo (Marschner, 1995; Mengel e Kirkby 2001).

Nella sperimentazione condotta in condizioni controllo, le correlazioni positive osservate tra ferro e rame, manganese, zinco e le correlazioni negative tra ferro con piombo e cobalto sono in accordo con quelle riportate per il ferro e lo zinco in piante di grano

(Cakmak et al., 2004; Ozkan et al., 2007) e piante di fagiolo (Beebe et al., 2000). Le correlazioni positive tra questi micronutrienti indicano che l'aumento di un micronutriente può contemporaneamente determinare l'aumento della concentrazione di altri micronutrienti come in precedenza riportato da altri autori (Ozkan et al., 2007; Baxter et al., 2009b; Ohkama-Ohtsu e Wasaki, 2010). Al contrario, la correlazione negativa del cobalto e del piombo con gli altri elementi potrebbe suggerire che essi competano per gli stessi ligandi presenti sui composti presenti nelle piante. Anche Morrissey nel 2009 ha osservato una correlazione negativa tra ferro e cobalto in *Arabidopsis thaliana* (Morrissey et al., 2009). È ben noto che il pomodoro è molto sensibile alla carenza di ferro (Lopez-Millan et al., 2009), ciò fa sì che la necessità di mantenere la corretta concentrazione di tale elemento nei tessuti sia molto importante. È stato riportato che i livelli di ferro sono mantenuti costanti attraverso la regolazione della sua omeostasi nella pianta (Baxter et al., 2008). I risultati qui riportati hanno mostrato, in entrambe le sperimentazioni, che sebbene il ferro sia il micronutriente che mostra il maggior numero di correlazioni con gli altri elementi, la sua concentrazione non è influenzata dalle variazioni degli altri elementi ed un basso numero di QTL sono stati associati alla variazione della sua concentrazione. In particolare, nelle piante controllo tutti i QTL identificati sono stati associati ad un decremento della sua concentrazione rispetto alla cv. M82 mentre, nelle piante trattate, 6 dei 7 QTL identificati risultavano associati all'aumento della sua concentrazione. Poiché il controllo della concentrazione del ferro è fondamentale per la pianta il suo bilanciamento è un processo dinamico e continuo che richiede l'utilizzo di una rete complessa di proteine regolatrici che intervengono per evitare le fluttuazioni improvvise di tale elemento (Briat et al., 2007; Kim e Guerinot, 2007; Pilon et al., 2009). Alcuni autori riportano che le concentrazioni di manganese, cobalto, zinco e cadmio sono elevate nelle piante studiate: ciò è il riflesso di un assorbimento accidentale di questi elementi attraverso gli stessi trasportatori del ferro (Baxter et al., 2008; Conte e Walker, 2011). Un fenomeno analogo è stato osservato anche nella sperimentazione qui riportata, ma solo per manganese e cobalto, forse a causa del diverso *background* genetico delle IL rispetto al materiale vegetale studiato dagli altri Autori.

Il decremento della concentrazione del sodio nelle IL allevate in condizioni di controllo rispetto alla cv. M82 è in accordo con quanto descritto in precedenza da Frary et al. (2011). I QTL associati a tale decremento sono risultati dispersi sull'intero genoma, indicando una sorta di indipendenza dall'introgressione. Per quanto riguarda il calcio e lo stronzio invece, anche se essi sono analoghi chimici ed è riportato che essi utilizzino gli

stessi meccanismi di trasporto per il loro assorbimento (Premendran et al., 2005; Kanter et al., 2010) solo in poche IL sono stati identificati QTL associati al loro concomitante incremento o decremento. Tali IL sono state raggruppate dall'analisi cluster unicamente nel primo e nel secondo cluster per le piante sottoposte al trattamento senza metalli pesanti. In particolare, la IL 4-3-2 ha mostrato un fenotipo particolarmente interessante per quanto riguarda l'accumulo di ioni bivalenti. Infatti, in questa linea sono stati individuati QTL riguardanti l'aumento della concentrazione di tutti gli elementi appartenenti al II gruppo della tavola di Mendeleev (magnesio, calcio, stronzio e bario) e all'accumulo di manganese, cobalto ed arsenico. Al contrario, sono state individuate solo due linee, la IL 2-2 e IL 8-2-1, che hanno mostrato QTL associati alla diminuzione della concentrazione di tutti gli elementi appartenenti al II gruppo chimico. Questi risultati suggeriscono che in tali IL siano stati introgressi tratti cromosomici di *S. pennellii* che abbiano portato ad una modifica della regolazione dei geni responsabili della trascrizione di trasportatori di membrana aspecifici quali ECA3, HMA1 e CAX2 (Hirschi et al., 2000). Un altro interessante fenotipo mostrato dalla IL 4-3-2 riguarda l'accumulo di magnesio e cobalto. In letteratura è riportato che in *A. thaliana* il trasporto del magnesio è inibito dagli elevati livelli di  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  (Li et al., 2001). I risultati ottenuti negli esperimenti qui presentati hanno confermato questo fenomeno in tutte le IL studiate ad eccezione della IL 4-3-2, nella quale sono stati identificati QTL associati all'incremento della concentrazione sia del magnesio sia del cobalto.

Poiché vanadio ed arsenico sono funzionalmente e chimicamente correlati sia al catione bivalente  $\text{Ca}^{2+}$  ed ai suoi analoghi sia ai metalli di transizione (Anke, 2004; Zhao et al., 2010), la presenza di numerose correlazioni del vanadio e dell'arsenico con molti elementi sono comprensibili, considerando che l'arsenico, nella sua forma anionica, è un analogo chimico del fosforo e potrebbe sostituirlo sia nei sistemi di trasporto sia nel metabolismo cellulare, mentre il vanadio e l'arsenico, nelle loro forme cationiche si comportano come un tipico elemento di transizione, entrando in competizione con i cationi metallici (Crans et al., 2004; Vachirapatama, 2011; Saco et al., 2012).

In piante controllo, sedici dei 20 QTL associati alla variazione della concentrazione dell'arsenico negli apici caulinari delle IL, sono risultati essere correlati all'aumento fino a 4 volte della sua concentrazione rispetto alla cv. M82. A dispetto della sua tossicità, ciò è in accordo con quanto riportato da Burlo et al. (1999) e da Goupil et al. (2009) circa la capacità di apici vegetativi di pomodoro di ben tollerare alte concentrazioni di arsenico, a dispetto della nota tossicità di tale elemento (Finnegan e Chen, 2012). Nella IL 9-1-2 sono

stati identificati QTL associati all'aumento simultaneo della concentrazione di molibdeno e rame. Dalla letteratura è noto che il metabolismo del molibdeno è intimamente legato a quello del ferro e del rame e che il rame è essenziale per la formazione di un cofattore intermedio della via di traslocazione del molibdeno (Kuper et al., 2004). Quindi i risultati di questa ricerca confermano la relazione tra rame e molibdeno trovata nella IL 9-1-2.

Solo nella IL 1-1-3 e nella IL 1-4 sono stati identificati QTL per l'accumulo dell'alluminio negli apici vegetativi delle piante controllo. Hoekenga et al. (2003, 2006) hanno individuato in *A. thaliana* uno o più loci associati alla tolleranza all'alluminio, fisicamente localizzati sul cromosoma 1 vicini al gene *AtALMT1* che codifica per il trasportatore responsabile dell'efflusso del malato. L'accumulo del citrato e del malato dalle radici è stato riportato come uno dei meccanismi di tolleranza all'alluminio in *A. thaliana*, grano e mais (Hoekenga et al., 2003; 2006; Ryan et al., 1995; Pellet et al., 1995). L'osservazione che l'alluminio è accumulato è molto interessante perché porta ad ipotizzare che l'accumulo di alluminio in queste IL potrebbe essere collegato ad un accumulo di malato e citrato nelle foglie, come già riportato per le radici. Questo possibile modello è supportato dal profilo metabolico ottenuto da Schauer et al. (2006; 2008) i quali hanno riportato l'accumulo di malato nella IL 1-1-3 e l'accumulo di citrato nella IL 1-4. L'accumulo di alluminio in quelle linee allevate in condizione controllo, ha mostrato non interferire con l'assorbimento, il trasporto e l'utilizzo di sostanze nutritive essenziali tra cui calcio, magnesio, potassio, fosforo, rame, ferro, manganese e zinco riportato da altri Autori (Guo et al., 2004; Bose et al., 2011). Infine, l'assorbimento dell'alluminio, correlato positivamente con quello del nichel, potrebbe essere spiegato considerando che entrambi questi elementi sono trasportati alle foglie apicali grazie allo stesso ligando (Chen et al., 2009a).

Concludendo, in condizioni controllo sono stati identificati numerosi QTL associati all'aumento o alla diminuzione di elementi utili sia per la biofortificazione del pomodoro che per la sicurezza alimentare di nuove varietà di pomodoro. Le IL che potrebbero essere utilizzate nella MAS per la biofortificazione del pomodoro sono la IL 4-3-2, che contiene elevati livelli di magnesio, calcio e stronzio importanti per la salute dell'uomo (Dahal et al. 2001); la IL 2-5 che mostra accumulare manganese e la IL 9-1-2 per l'accumulo di rame. Sono invece da considerare nel miglioramento genetico avente come obiettivo la sicurezza alimentare la linea IL 7-2, che porta un QTL associato alla più bassa concentrazione di cadmio riscontrata tra le IL e la IL 8-2-1 che mostra QTL correlati sia alla più bassa concentrazione di sodio sia di alluminio ed arsenico.

Alcune IL, al contrario, sarebbero da evitare o da usare con cautela nel miglioramento genetico del pomodoro poiché hanno QTL associati ad elevate concentrazioni di elementi potenzialmente tossici. Infatti, sono stati identificati QTL associati all'accumulo di nichel nella IL 1-1-3, all'accumulo di alluminio nella IL 1-4, all'accumulo di cromo nella IL 2-2, all'accumulo di cobalto e piombo nella IL 3-5 e di arsenico nella IL 12-4. Sarebbe inoltre da evitare anche la IL 12-1-1 perché mostra QTL associati sia alla più bassa concentrazione di magnesio sia ad elevate concentrazioni di vanadio, cromo ed arsenico.

L'analisi dell'ionoma di piante trattate con concentrazioni non letali di elementi tossici ha mostrato un incremento generale del numero di correlazioni, tutte positive, tra gli elementi. Nella soluzione di irrigazione utilizzata nelle piante trattate erano presenti, come descritto nella sezione Materiali e Metodi, i seguenti elementi: arsenico, piombo, nichel, cromo, rame, cadmio e zinco.

La mancanza delle correlazioni negative del cobalto e del piombo con gli altri elementi, presente invece nelle piante controllo, potrebbe essere dovuta alla influenza degli elementi aggiunti alla soluzione di irrigazione, che presenti in elevate concentrazioni nel suolo inducono l'attivazione di meccanismi molecolari di assorbimento, traslocazione e accumulo in risposta al trattamento, influenzando differenzialmente l'assorbimento degli altri elementi. La presenza di correlazioni significative tra nichel, zinco e rame è in accordo con quanto riportato da Kochian (1991): ancora, la correlazione tra nichel e magnesio che è stata da rilevata negli esperimenti qui riportati è supportata da analoghe osservazioni (Oller et al., 1997). Inoltre è noto che l'assorbimento del nichel inibisce quello del magnesio perché questi due elementi competono per gli stessi trasportatori (Seregnin et al., 2006). Tale comportamento è stato mostrato dalle IL 4-3 e IL 7-4, nelle quali potrebbe essere stato introgresso il tratto di *S. pennellii* recante i geni implicati nel meccanismo di inibizione dell'assorbimento del magnesio in presenza di nichel. È noto che elevate concentrazioni di rame possono indurre l'incremento della concentrazione del nichel, aumentandone la sua tossicità (Nieminem, 2004).

A seguito del trattamento imposto alle piante con la soluzione contenente anche rame e nichel, l'aumento di concentrazione di tali elementi è stato osservato in sole 9 IL. Tale risultato, se da un lato non escludono che tali elementi siano accumulati seguendo vie indipendenti di accumulo senza alcuna interdipendenza tra loro, dall'altro canto potrebbero indicare che nei tratti introgressi di *S. pennellii* siano presenti le informazioni genetiche necessarie ad attivare i meccanismi molecolari descritti da Neaminen (2004), come lascerebbe pensare che solo in queste IL siano stati identificati QTL associati all'aumento

concomitante di rame e nichel, mentre nelle sole IL 4-1 e IL 8-3-1 sono stati identificati QTL associati all'aumento del rame ed alla concomitante riduzione del nichel. È riportato in letteratura che alte concentrazioni di calcio possano ridurre notevolmente quella di nichel, tanto da poter utilizzare il primo catione per diminuire l'accumulo del secondo elemento in colture allevate in suoli ricchi di nichel (Gabrielli e Pandolfini 1984). Poiché in nessuna IL sono stati individuati QTL associati all'incremento dell'accumulo di calcio rispetto alla cv. M82, l'effetto descritto da Gabrielli non è stato riscontrato nella sperimentazione qui riportata.

Tra gli elementi pesanti presenti nei suoli, il cadmio è considerato l'elemento più tossico per le piante a causa della sua alta solubilità in acqua (Dal Corso et al., 2010) cosa che consente un suo rapido assorbimento e il suo ingresso nella catena alimentare causando danni anche ai consumatori secondari (Buchet et al., 1990). Nelle piante il cadmio provoca scompensi nell'omeostasi degli elementi minerali, nella crescita delle radici, nello sviluppo della pianta (Macek et al., 2002; Farinati et al., 2010), malfunzionamento della catena di trasporto degli elettroni (Dal Corso et al., 2008), produzione di ROS e perossidazione dei lipidi nonché il blocco del trasporto dell'acqua causando l'accumulo di prolina (Shat et al., 1997). Malgrado sia riportato in letteratura che lo stress da cadmio attivi le MAP chinasi e con conseguente aumento della concentrazione del calcio (Jonak et al., 2004), nelle condizioni sperimentali qui mostrate l'aumento del cadmio non è stato riscontrato alcun aumento di calcio. Il cadmio è assorbito dalle piante insieme al ferro, allo zinco e al manganese (Clemens, 2006). Il trasportatore aspecifico per il ferro più studiato è IRT1, appartenente alla famiglia delle proteine ZIP. Nelle piante trattate, tutte le IL nelle quali sono stati identificati QTL associati all'accumulo contemporaneo di ferro e cadmio, ad eccezione della IL 9-3-1, confermano quindi i dati presenti in letteratura relativi all'utilizzo nelle piante di uno stesso trasportatore per entrambi gli elementi. Tale risultato suggerisce che su le porzioni di cromosomi di *S. pennelli* introgressi nelle IL in cui sono stati identificati QTL per l'accumulo contemporaneo di ferro e cadmio potrebbero essere presenti geni responsabili della codifica e/o della regolazione delle famiglie di trasportatori di questi elementi.

I trasportatori IRT della famiglia delle ZIP, come detto, possono trasportare anche zinco e manganese. Delle 9 IL, in cui sono stati individuati QTL correlati all'aumento della concentrazione dello zinco, 5 mostrano QTL associati anche all'aumento del cadmio, mentre su 11 IL nelle quali sono stati identificati QTL associati alla diminuzione dello zinco, in 10 di esse sono stati identificati QTL associati alla diminuzione del cadmio. Unica

eccezione è la IL 10-2 nella quale pur essendo stati identificati QTL associati alla diminuzione dello zinco non sono stati identificati QTL associati alla concomitante diminuzione o aumento del cadmio.

Le linee IL 2-3, IL 5-2 e IL 10-2-2 risultano particolarmente interessanti perché in esse sono stati identificati QTL correlati con l'incremento contemporaneo di cadmio, ferro, zinco e manganese. Inoltre le prime due linee, oltre ad essere le uniche a comporre il secondo cluster, sono caratterizzate dalla presenza di QTL associati all'aumento concomitante non solo di rame, manganese, ferro e zinco ma anche dei metalli pesanti quali cromo, nichel e piombo.

L'arsenico è un elemento altamente tossico per tutte le forme di vita sul nostro pianeta. Negli ultimi decenni la sua presenza nelle acque e nei suoli è aumentata vertiginosamente facendo divenire sempre più problematica la gestione dell'inquinamento ad esso correlato (Christen, 2001). L'arsenico in natura si trova sotto due forme: arsenato (As V) o arsenito (As III). Entrambe le forme di arsenico sono altamente tossiche. L'arsenato è molto simile chimicamente al fosfato e agisce quindi come un suo analogo tanto da essere trasportato nelle cellule vegetali mediante i trasportatori del fosfato (Meharg e Macnair, 1991); esso, interferendo con il metabolismo dei fosfati, blocca le fosforilazioni e la sintesi di ATP. L'arsenito e le sue forme metilate sono trasportati nella pianta attraverso le proteine NIP, una famiglia di proteine transmembrana appartenenti alla famiglia delle aquaporine (Zhao et al., 2010; Mosa et al., 2012); esso lega i gruppi sulfidrilici delle proteine inficiandone la struttura e la loro funzione catalitica (Tripathi et al., 2007; Zhao et al., 2010). In riso è stato trovato un gene di tolleranza all'arsenico, nella forma di arsenato; tale gene è stato mappato sul cromosoma 6. Inoltre recentemente è stata trovata un'interazione epistatica di tre geni, due dei quali sul cromosoma 6 ed uno sul cromosoma 10 (Norton et al., 2008). Zhang ha identificato un QTL correlato all'accumulo di arsenico negli apici caulinari di riso che mappa sul cromosoma 2, un QTL associato all'accumulo di arsenico nelle radici sul cromosoma 3 e un QTL per l'accumulo di arsenico nell'endosperma sui cromosomi 6 e 8 (Zhang et al., 2007). I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che anche in pomodoro sul cromosoma 2 sono presenti QTL associati all'aumento della concentrazione di arsenico negli apici di piante trattate (IL 2-2) e in piante controllo (IL 2-3 e IL2-5) similmente a quanto pubblicato da Zhang et al. (2007).

In mais, un recente studio condotto su differenti organi e tessuti usando una popolazione di RIL (Ding et al., 2011) ha dimostrato che l'accumulo di arsenico in differenti tessuti è controllato da differenti meccanismi molecolari. Nello specifico, gli Autori hanno identificato

QTL nei cromosomi 1, 5 e 8 associati all'accumulo di arsenico nelle foglie. Nelle condizioni controllo degli esperimenti qui riportati è stato identificato un QTL associato all'accumulo di arsenico nella IL 5-2 e nessun QTL associato all'accumulo di tale elemento nelle piante trattate.

Le piante trattate sono state poste in presenza di elevate concentrazioni di rame, un micronutriente essenziale, che è tossico ad elevate concentrazioni. Il trasportatore IRT1 della famiglia delle proteine ZIP trasporta di norma oltre al ferro anche manganese, cadmio e zinco ma non il rame (Korshunova et al., 1999). La famiglia genica responsabile dell'assorbimento e del trasporto del rame è la Copper Transporter family (CTR). In *A. thaliana* sono stati identificati molti geni, denominati COPT, appartenenti a questa famiglia (Sancenon et al., 2003) e dispersi su tutto il genoma. Nelle condizioni di trattamento la ricerca qui presentata ha identificato 25 QTL associati all'accumulo di questo metallo in 25 IL e dispersi su tutti i cromosomi, ad eccezione del cromosoma 1. Questi risultati sono in accordo con la grandezza della famiglia genica delle CTR e alla dispersione nel genoma dei geni costituenti la stessa. QTL associati ad una diminuzione del rame sono stati identificati in una sola IL: è possibile ipotizzare che in questa linea sia presente un gene che inibisce il ruolo dei geni COPT e ciò potrebbe essere di interesse per successivi studi. La carenza di zinco riduce la produttività e la qualità delle colture in vaste aree agricole mondiali (Graham et al., 1992; Cakmak et al., 1998). Nel recente passato la ricerca ha compiuto un grande sforzo per determinare la base genetica della tolleranza della deficienza di zinco nel frumento (Graham et al., 1992; Cakmak et al., 1998), nel riso (Gao et al., 2005) e nell'orzo (Genc et al., 2002). Lonergan (2001) ha identificato QTL associati alla concentrazione di zinco nella foglia di orzo sulla porzione di cromosoma 4HS. Recentemente, uno studio condotto sul farro ha individuato un QTL sulla porzione di cromosoma 6B correlato con l'accumulo di zinco e ferro nella granella (Distelfeld et al., 2007). In *Triticum monococcum*, grazie all'utilizzo di una popolazione RIL, è stato identificato sul cromosoma 5 un QTL maggiore che è stato associato ad elevati contenuti di zinco, ferro, rame e manganese nella granella (Ozkan et al., 2006). Infine, 12 QTL correlati alla variazione di concentrazione dello zinco sono stati identificati in grano (Genc et al., 2009) sui cromosomi 2, 4, 5 e 6. Tra questi, l'allele RAC875-2 localizzato sul cromosoma 4 è stato associato all'aumento della concentrazione di questo elemento. Nelle condizioni di trattamento, dagli esperimenti qui mostrati è risultato che concentrazioni elevate di zinco risultano essere presenti in 10 IL tra le quali alcune dei cromosomi 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 11 e 12. Inoltre, solo in tre casi su 10 è stato rilevato un

concomitante aumento dello zinco e del ferro, fenomeno ampiamente descritto in letteratura.

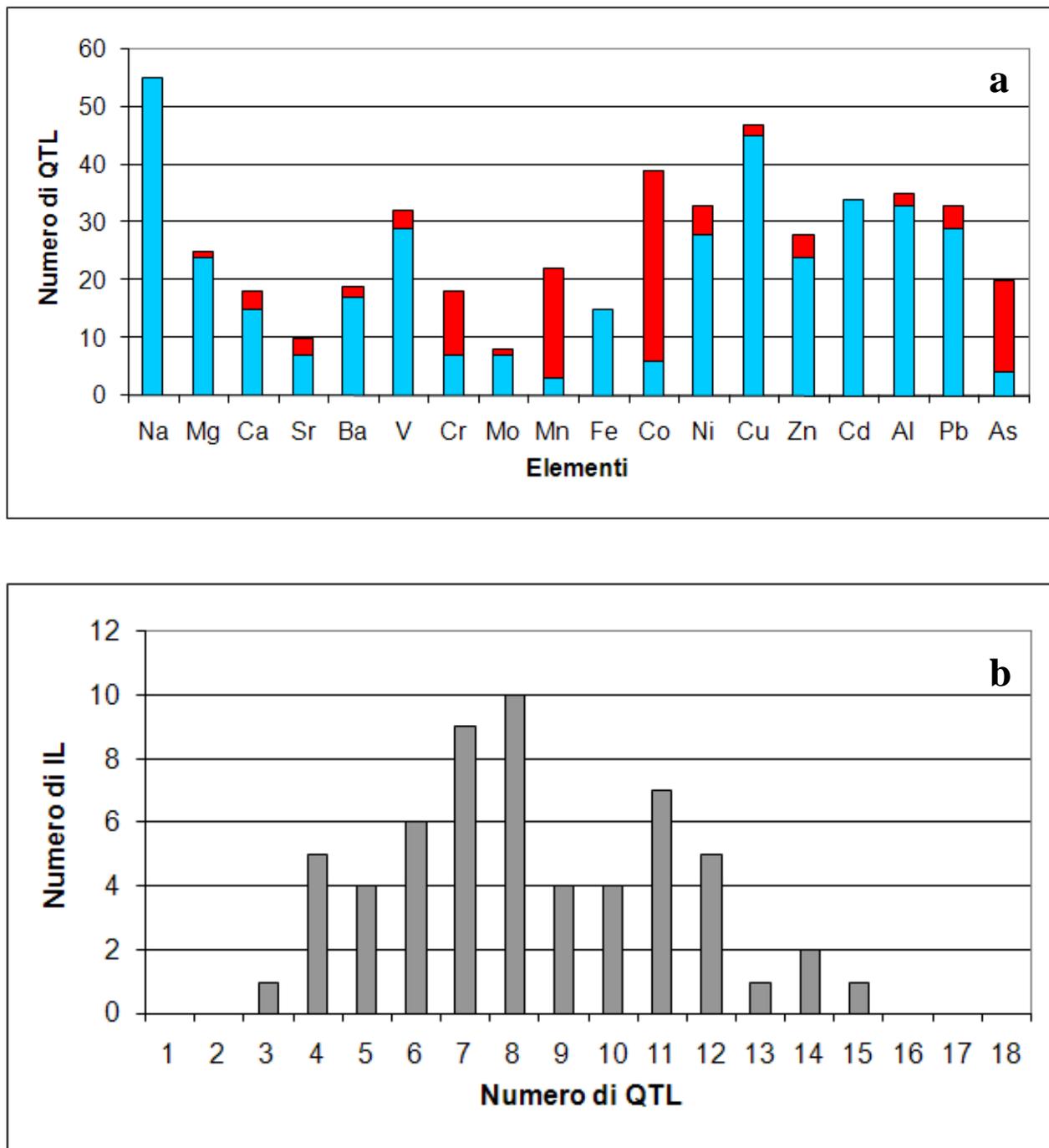
In conclusione, anche in piante trattate sono stati individuati numerosi QTL associati all'aumento o alla diminuzione della concentrazione di diversi elementi nell'apice del caule. La IL che potrebbe essere utilizzate nella MAS per la sicurezza alimentare è la IL 6-4 che ha mostrato una diminuzione della concentrazione di rame rispetto alla cultivar parentale. Inoltre sono da prendere in considerazione le IL appartenenti al cromosoma 1, nelle quali sono stati individuati QTL per una diminuzione della concentrazione dello zinco e del cadmio. Sono risultate da escludere in progetti di miglioramento genetico per l'ottenimento di nuove cultivar le ultime due IL del cromosoma 11 e le prime due del cromosoma 12 che, in condizioni di trattamento, hanno mostrato QTL associati all'accumulo contemporaneo di vanadio, cromo, nichel, cadmio, arsenico oltre che di sodio. Al contrario, alcune IL non dovrebbero essere utilizzate quali parentali in programmi di miglioramento genetico se i genotipi risultanti debbano poi essere coltivati in suoli moderatamente inquinati. Queste linee sono la IL 2-3, per l'elevato contenuto di cromo, nichel e rame; la IL 5-2, per l'elevato contenuto di cromo; la IL 11-4-1, per l'elevato contenuto di cadmio.

## 5. CONCLUSIONI

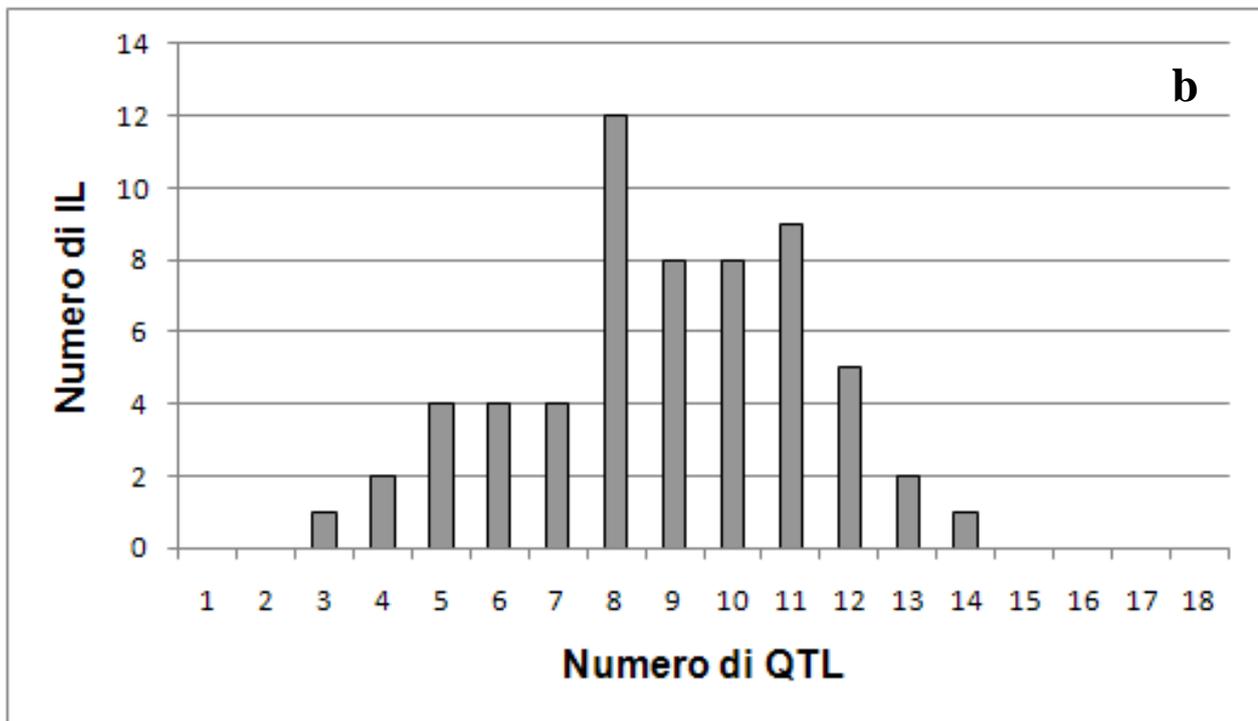
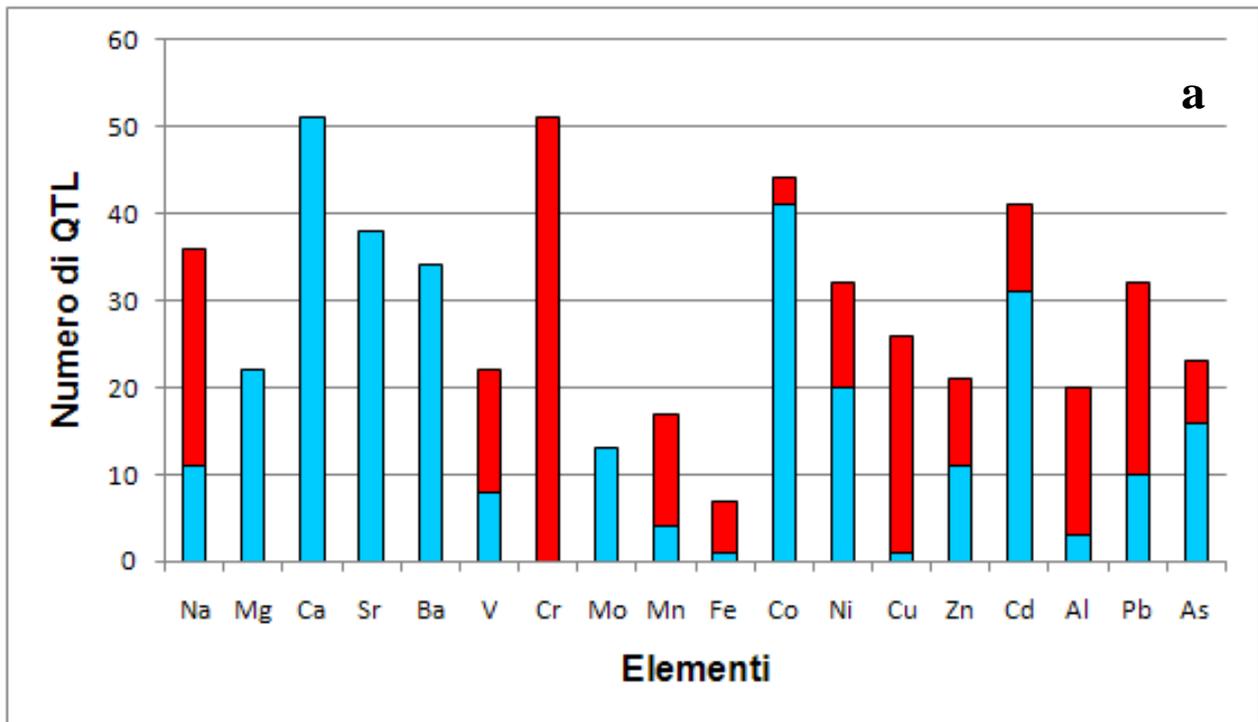
I risultati presentati in questa tesi, i primi riguardanti la ionomica del pomodoro ed ottenuti studiando delle linee di introgressione omozigoti provenienti dall'incrocio tra *S. lycopersicum* e *S. pennellii*, mostrano che l'omeostasi dei diversi ioni sono strettamente collegate tra loro, come già osservato per *Arabidopsis thaliana* (Lahner et al., 2003; Salt et al., 2008; Baxter et al., 2012), *Lotus japonica* (Chen et al., 2009b), *Oryza sativa* (Norton et al., 2010), *Glicine max* (Ziegler et al., 2012). Le risposte osservate nelle IL sono risultate fortemente dipendenti dalla specifica introgressione, come già riportato anche per la produzione di antiossidanti negli studi di tolleranza al sale (Frary et al., 2010; 2011) e per i profili dei metaboliti (Schauer et al., 2006; Frusciante et al., 2007; Schauer et al., 2008; Di Matteo et al., 2012, Stevens et al., 2007). I numerosi QTL identificati nelle diverse IL ed associati alla variazione della concentrazione dello stesso elemento, osservati sia in condizioni controllo sia di trattamento, suggeriscono che la regolazione dell'assorbimento, del trasporto e dell'accumulo degli elementi sono fenomeni complessi e coinvolgono famiglie geniche. Ancora una volta è ben evidente che un singolo cambiamento fisiologico nella pianta come il cambiamento di una concentrazione di un singolo elemento può produrre risposte complesse nel sistema pianta (Ruffel et al., 2010).

Nonostante la complessità dei fenomeni studiati, i risultati raccolti hanno consentito di identificare, sia in condizioni controllo sia in condizioni di trattamento con elementi tossici, QTL utili per futuri piani sperimentali di miglioramento genetico assistito da marcatori molecolari e non, che intendano produrre nuove cultivar di pomodoro con concentrazioni elevate di elementi utili alla salute umana e/o concentrazioni ridotte di quelli considerati tossici. Questo studio quindi può essere considerato un punto di partenza che apre la strada a futuri approfondimenti della genetica che è alla base della biochimica e della ionomica del pomodoro e, come ricerca traslazionale in campo vegetale, alle sue applicazioni al miglioramento genetico di precisione.

## 6. FIGURE



**Figura 1. Distribuzione dei QTL in piante controllo. (a)** numero di QTL associati all'aumento (barre rosse) o alla diminuzione (barre blu) del contenuto degli elementi; **(b)** frequenza di QTL trovata in tutte le IL per tutti gli elementi saggati.



**Figura 2. Distribuzione dei QTL in piante trattate.** (a) numero di QTL associati all'aumento (barre rosse) o alla diminuzione (barre blu) del contenuto degli elementi; (b) frequenza di QTL trovata in tutte le IL per tutti gli elementi saggiati.

Genotipo	ELEMENTI																	
	Na	Mg	Ca	Sr	Ba	V	Cr	Mo	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Al	Pb	As
IL 1-1																		
IL 1-1-3																		
IL 1-2																		
IL 1-4																		
IL 1-4-18																		
IL 2-1																		
IL 2-1-1																		
IL 2-2																		
IL 2-3																		
IL 2-4																		
IL 2-5																		
IL 2-6-5																		
IL 3-1																		
IL 3-2																		
IL 3-5																		
IL 4-1																		
IL 4-1-1																		
IL 4-2																		
IL 4-3																		
IL 4-3-2																		
IL 4-4																		
IL 5-1																		
IL 5-2																		
IL 5-3																		
IL 5-4																		
IL 5-5																		
IL 6-1																		
IL 6-2																		
IL 6-3																		
IL 6-4																		
IL 7-1																		
IL 7-2																		
IL 7-4																		
IL 7-4-1																		
IL 8-1																		
IL 8-1-1																		
IL 8-2-1																		
IL 8-3																		
IL 8-3-1																		
IL 9-1																		
IL 9-1-2																		
IL 9-1-3																		
IL 9-2-5																		
IL 9-3																		
IL 9-3-1																		
IL 9-3-2																		
IL 10-1																		
IL 10-1-1																		
IL 10-2																		
IL 10-2-2																		
IL 10-3																		
IL 11-1																		
IL 11-2																		
IL 11-4-1																		
IL 12-1																		
IL 12-1-1																		
IL 12-3-1																		
IL 12-4																		
IL 12-4-1																		

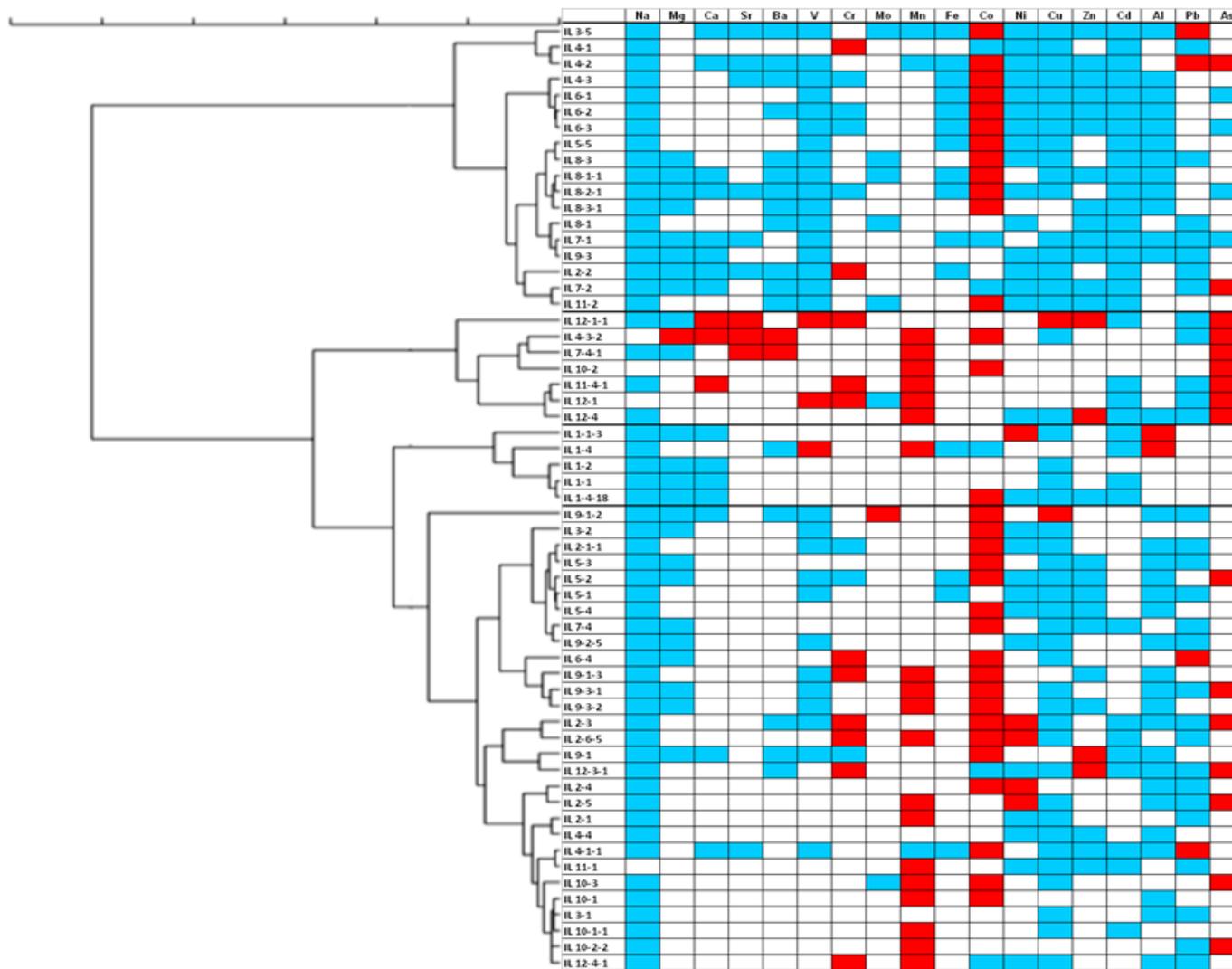
**Figura 3. QTL indentificati nelle piante controllo (IL) ordinate per cromosoma.**

Le caselle rosse indicano QTL associati con un aumento della concentrazione dell'elemento rispetto a quella rilevata nella cv. M82, le caselle blu quelli associati con una diminuzione. Le caselle bianche indicano che la differenza tra la concentrazione di quell'elemento in quella IL e la concentrazione dello stesso nella cv. M82 non sono statisticamente significative. I QTL sono stati identificati secondo la definizione di Rousseaux et al., (2005).

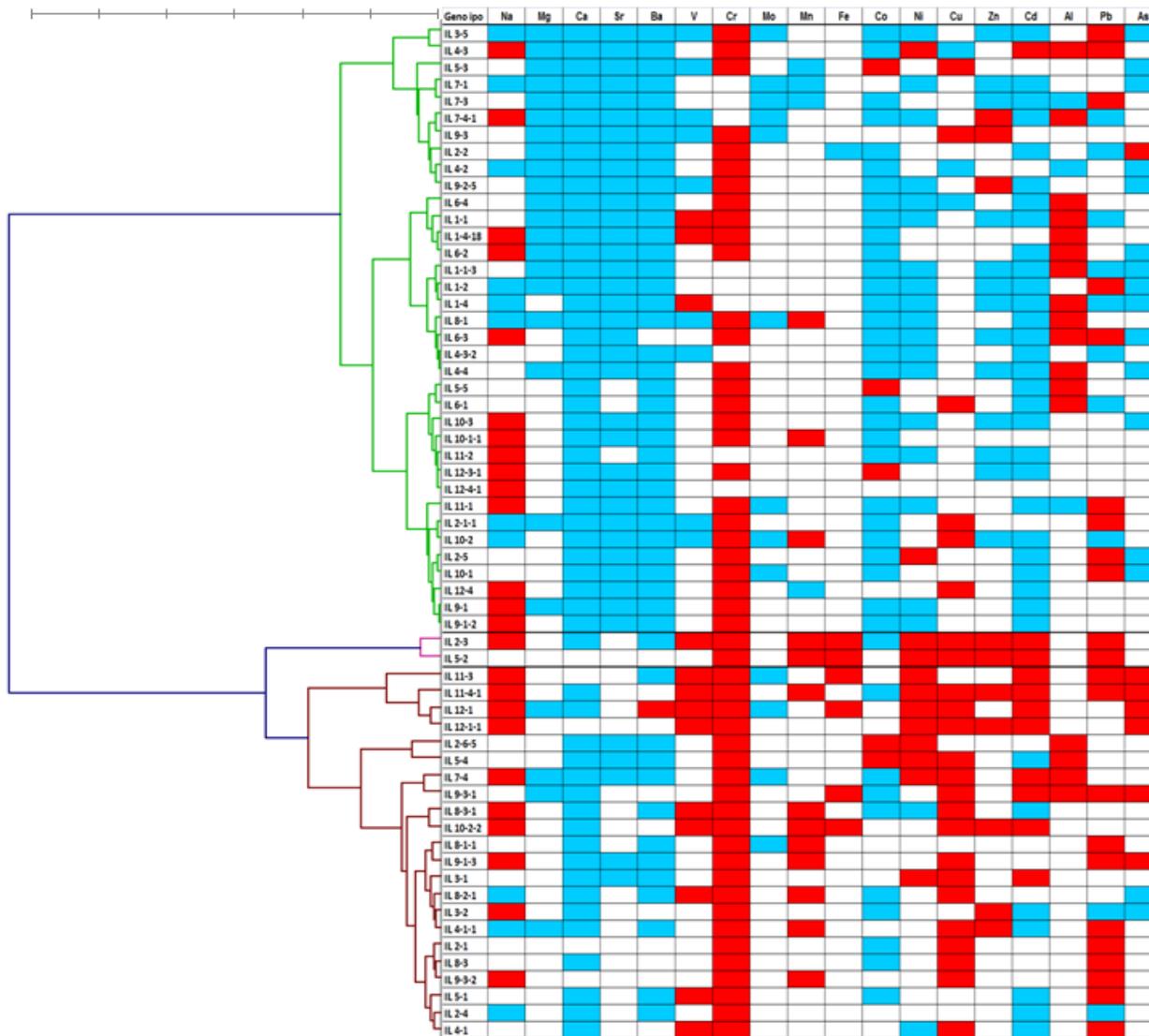
Genotipo	ELEMENTI																	
	Na	Mg	Ca	Sr	Ba	V	Cr	Mo	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Al	Pb	As
IL 1-1																		
IL 1-1-3																		
IL 1-2																		
IL 1-4																		
IL 1-4-18																		
IL 2-1																		
IL 2-1-1																		
IL 2-2																		
IL 2-3																		
IL 2-4																		
IL 2-5																		
IL 2-6-5																		
IL 3-1																		
IL 3-2																		
IL 3-5																		
IL 4-1																		
IL 4-1-1																		
IL 4-2																		
IL 4-3																		
IL 4-3-2																		
IL 4-4																		
IL 5-1																		
IL 5-2																		
IL 5-3																		
IL 5-4																		
IL 5-5																		
IL 6-1																		
IL 6-2																		
IL 6-3																		
IL 6-4																		
IL 7-1																		
IL 7-3																		
IL 7-4																		
IL 7-4-1																		
IL 8-1																		
IL 8-1-1																		
IL 8-2-1																		
IL 8-3																		
IL 8-3-1																		
IL 9-1																		
IL 9-1-2																		
IL 9-1-3																		
IL 9-2-5																		
IL 9-3																		
IL 9-3-1																		
IL 9-3-2																		
IL 10-1																		
IL 10-1-1																		
IL 10-2																		
IL 10-2-2																		
IL 10-3																		
IL 11-1																		
IL 11-2																		
IL 11-3																		
IL 11-4-1																		
IL 12-1																		
IL 12-1-1																		
IL 12-3-1																		
IL 12-4																		
IL 12-4-1																		

**Figura 4. QTL indentificati nelle piante trattate (IL) ordinate per cromosoma.**

Le caselle rosse indicano QTL associati con un aumento della concentrazione dell'elemento rispetto a quella rilevata nella cv. M82, le caselle blu quelli associati con una diminuzione. Le caselle bianche indicano che la differenza tra la concentrazione di quello elemento in quella IL e la concentrazione dello stesso nella cv. M82 non sono statisticamente significative. I QTL sono stati identificati secondo la definizione di Rousseaux et al., (2005).



**Figura 5. Analisi Cluster e distribuzione dei QTL in piante controllo.** Le IL sono raggruppate in 4 cluster in base al dendrogramma scaturito dall'analisi cluster.



**Figura 6. Analisi Cluster e distribuzione dei QTL in piante trattate.** Le IL sono raggruppate in 3 cluster in base al dendrogramma scaturito dall'analisi cluster.

## 7. TABELLE

**Tabella 1. Analisi di correlazione tra le concentrazioni degli elementi negli apici caulinari di *S. lycopersicum* cv. M82 e 59 IL di piante controllo.**

Ogni valore rappresenta l'indice di correlazione tra l'elemento della colonna e quello della riga. I coefficienti di correlazione e le significatività sono stati calcolati applicando la formula di Pearson con  $p < 0,05$ . Le correlazioni non significative sono riportate con il simbolo n.s.

Elementi	Mg	Ca	Sr	Ba	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Mo	Al	Pb	As
Na	<b>0,381</b>	<b>0,365</b>	<b>0,323</b>	<b>0,358</b>	<b>0,300</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,359</b>
Mg		<b>0,491</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,288</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,284</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Ca			<b>0,847</b>	<b>0,770</b>	<b>0,449</b>	n.s.	<b>0,593</b>	<b>0,656</b>	<b>-0,293</b>	n.s.	n.s.	<b>0,365</b>	<b>0,518</b>	n.s.	n.s.	<b>-0,385</b>	<b>0,427</b>
Sr				<b>0,846</b>	<b>0,400</b>	<b>0,287</b>	<b>0,540</b>	<b>0,743</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,474</b>	<b>0,528</b>	n.s.	n.s.	<b>-0,339</b>	<b>0,511</b>
Ba					<b>0,287</b>	n.s.	<b>0,398</b>	<b>0,600</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,271</b>	<b>0,601</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,367</b>
V						<b>0,417</b>	<b>0,369</b>	<b>0,409</b>	<b>-0,308</b>	<b>0,281</b>	n.s.	<b>0,451</b>	n.s.	n.s.	<b>0,552</b>	n.s.	<b>0,515</b>
Cr							n.s.	<b>0,457</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,328</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>-0,262</b>	<b>0,481</b>
Mn								<b>0,664</b>	<b>-0,283</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,515</b>	<b>0,352</b>	n.s.	<b>-0,487</b>	<b>0,425</b>
Fe									<b>-0,280</b>	<b>0,423</b>	<b>0,261</b>	<b>0,460</b>	<b>0,542</b>	<b>0,330</b>	n.s.	<b>-0,390</b>	<b>0,371</b>
Co										n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<b>-0,297</b>	<b>0,772</b>	<b>-0,304</b>
Ni											n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,441</b>	<b>0,407</b>	n.s.	n.s.
Cu												<b>0,263</b>	n.s.	<b>0,355</b>	n.s.	n.s.	n.s.
Zn													<b>0,278</b>	n.s.	n.s.	n.s.	<b>0,443</b>
Cd														<b>0,480</b>	n.s.	n.s.	n.s.
Mo															n.s.	n.s.	n.s.
Al																n.s.	n.s.
Pb																	<b>-0,324</b>

**Tabella 2. Analisi di correlazione tra le concentrazioni degli elementi negli apici caulinari di *S. lycopersicum* cv. M82 e 59 IL di piante irrigate con una soluzione contenente metalli pesanti (vedi *Materiali e Metodi*).**

Ogni valore rappresenta l'indice di correlazione tra l'elemento della colonna e quello della riga. I coefficienti di correlazione e le significatività sono stati calcolati applicando la formula di Pearson con  $p < 0,05$ . Le correlazioni non significative sono riportate con il simbolo n.s.

<b>Elementi</b>	<b>Mg</b>	<b>Ca</b>	<b>Sr</b>	<b>Ba</b>	<b>V</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Co</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Cd</b>	<b>Mo</b>	<b>Al</b>	<b>Pb</b>	<b>As</b>
<b>Na</b>	0,348	0,489	0,432	n.s.	0,255	n.s.	n.s.	0,354	n.s.	0,292	n.s.	n.s.	0,402	n.s.	n.s.	n.s.	0,699
<b>Mg</b>		0,725	0,644	0,422	0,308	0,329	0,542	0,464	n.s.	0,385	0,316	n.s.	0,307	0,629	n.s.	n.s.	0,308
<b>Ca</b>			0,918	0,689	0,388	0,267	0,508	0,675	n.s.	0,407	0,310	0,390	0,422	0,408	n.s.	n.s.	0,566
<b>Sr</b>				0,799	0,481	0,271	0,576	0,757	n.s.	0,414	0,340	0,460	0,499	0,405	n.s.	n.s.	0,562
<b>Ba</b>					0,410	n.s.	0,504	0,602	n.s.	n.s.	n.s.	0,393	0,312	0,331	n.s.	n.s.	0,287
<b>V</b>						n.s.	0,377	0,551	n.s.	n.s.	n.s.	0,267	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Cr</b>							0,399	0,368	n.s.	0,874	0,759	0,601	0,780	0,435	n.s.	0,296	n.s.
<b>Mn</b>								0,618	n.s.	0,378	0,447	0,506	0,413	0,434	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Fe</b>									n.s.	0,511	0,498	0,541	0,469	0,412	n.s.	n.s.	0,359
<b>Co</b>										n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	0,436	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Ni</b>											0,792	0,698	0,846	0,438	n.s.	n.s.	0,330
<b>Cu</b>												0,707	0,705	0,431	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Zn</b>													0,722	0,398	n.s.	n.s.	0,353
<b>Cd</b>														0,254	n.s.	n.s.	0,495
<b>Mo</b>															n.s.	n.s.	n.s.
<b>Al</b>																n.s.	n.s.
<b>Pb</b>																	n.s.

**Tabella 3. Differenza espressa in percentuale tra il contenuto degli elementi per ogni IL e quello degli stessi nella cv. M82 in piante controllo.**

Il contenuto degli elementi è stato determinato mediante analisi ICP-MS su 4 repliche biologiche.

In grassetto sono riportati i valori superiori al 30% indicativi della presenza di QTL sulla porzione introgressa del cromosoma.

Genotipo	ELEMENTI																	
	Na	Mg	Ca	Sr	Ba	V	Cr	Mo	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Al	Pb	As
IL 1-1	-72,4	-52,8	-43,2	-30,7	-28,4	13,6	10,4	-24,7	16,6	-21,3	28,7	26,0	-53,7	-25,0	-34,0	65,0	8,0	28,2
IL 1-1-3	-53,7	-56,0	-52,0	-27,8	-28,7	-7,5	-10,5	29,5	-3,9	-16,5	17,2	<b>334,4</b>	-46,2	-13,1	-35,1	<b>76,5</b>	13,8	33,0
IL 1-2	-78,6	-33,2	-32,7	-26,9	-28,4	31,7	9,8	10,4	23,3	-5,9	32,4	24,1	-51,4	-11,0	-14,7	40,8	9,7	34,6
IL 1-4	-67,2	4,2	-3,8	-24,9	-32,8	<b>72,0</b>	-9,1	17,9	<b>40,5</b>	-32,4	-71,2	43,1	1,1	2,7	-31,0	<b>204,2</b>	-20,2	32,2
IL 1-4-18	-70,7	-44,0	-34,4	-30,4	-26,8	16,0	36,9	-32,5	35,0	-26,3	<b>40,1</b>	-42,6	-52,5	-35,1	-42,6	35,8	4,9	34,8
IL 2-1	-62,1	-23,4	7,6	6,5	3,0	-13,3	-51,5	14,0	<b>92,1</b>	-21,3	29,2	-45,6	-55,9	6,6	9,2	-30,6	-44,9	72,6
IL 2-1-1	-71,0	-24,5	22,2	5,2	-5,6	-58,2	-47,9	8,0	28,2	-29,0	<b>66,6</b>	-61,3	-48,9	-16,1	-16,8	-50,0	-50,4	-8,9
IL 2-2	-75,1	-43,2	-42,8	-43,0	-44,7	-100,0	<b>121,2</b>	-2,5	-15,1	-45,0	-1,4	-91,1	-47,3	-26,5	-45,6	-24,8	-68,4	23,9
IL 2-3	-80,4	-18,4	-22,3	-30,9	-52,4	-37,4	<b>67,5</b>	10,2	43,2	-14,1	<b>94,4</b>	<b>105,4</b>	-53,5	-12,8	-60,4	-54,4	-100,0	<b>95,1</b>
IL 2-4	-69,7	-1,0	17,4	17,7	-4,6	-27,3	-35,9	14,3	74,3	25,5	<b>156,7</b>	<b>55,4</b>	-25,6	19,5	-6,9	-62,6	-41,7	-3,5
IL 2-5	-65,3	10,3	5,4	9,3	-18,9	-9,7	26,9	0,0	<b>145,7</b>	26,0	32,0	<b>38,9</b>	-35,7	-0,6	-21,6	-49,5	-100,0	<b>51,2</b>
IL 2-6-5	-57,3	-11,0	6,4	-2,0	-27,5	34,1	<b>99,1</b>	28,5	<b>40,7</b>	16,4	<b>102,5</b>	<b>130,2</b>	-35,7	-5,5	-39,0	-20,4	-100,0	7,8
IL 3-1	-56,7	-16,9	2,5	-3,9	-18,7	-3,2	3,1	-1,1	40,5	-5,7	19,8	15,5	-50,6	3,8	-29,0	-45,7	-81,9	18,1
IL 3-2	-68,5	-33,6	-17,8	-13,9	-7,2	-30,9	-41,3	18,4	15,4	-26,7	<b>439,5</b>	-65,7	-58,6	-24,3	-25,5	-29,6	42,7	-2,1
IL 3-5	-77,3	-23,3	-36,6	-39,6	-37,0	-61,0	-22,0	-42,7	-43,7	-48,3	<b>724,0</b>	-71,9	-65,6	-53,5	-44,3	-50,3	<b>204,5</b>	-29,4
IL 4-1	-42,8	-20,5	7,0	-5,7	-23,5	9,0	<b>46,7</b>	-20,5	63,9	-12,3	-43,8	-41,0	-45,9	-29,3	-49,7	-31,3	-83,4	38,1
IL 4-1-1	-57,0	-20,2	-35,3	-38,8	-22,7	-70,6	-2,4	-31,7	-39,7	-48,9	<b>440,6</b>	-25,8	-58,9	-53,2	-40,5	-44,9	<b>152,3</b>	-29,8
IL 4-2	-38,6	-20,1	-41,0	-47,5	-30,3	-60,2	-26,1	-14,1	-43,2	-54,3	<b>255,8</b>	-37,8	-57,7	-52,1	-48,6	-34,7	<b>65,4</b>	<b>44,3</b>
IL 4-3	-67,2	-8,4	-32,5	-43,6	-42,0	-31,7	-58,0	-25,9	11,4	-41,5	<b>177,3</b>	-59,0	-65,7	-44,0	-34,0	-42,0	49,1	9,8
IL 4-3-2	-29,5	<b>48,2</b>	<b>53,0</b>	<b>67,0</b>	<b>49,8</b>	-13,3	-19,4	-1,2	<b>51,3</b>	6,8	<b>71,1</b>	-20,8	-48,5	-3,7	28,6	-34,7	-56,4	<b>69,2</b>
IL 4-4	-43,8	3,9	24,7	14,4	3,7	-2,4	-38,6	14,3	39,5	-10,7	6,6	-32,4	-41,8	-31,0	-5,8	-37,9	-24,9	41,2
IL 5-1	-73,5	-26,4	-7,8	-10,7	-21,8	-38,6	-39,8	-16,8	41,2	-31,5	21,7	-39,1	-51,0	-41,8	-28,4	-52,7	-39,8	31,1
IL 5-2	-83,7	-31,2	2,9	8,0	-13,5	-40,4	-47,6	-16,4	11,9	-30,5	<b>84,1</b>	-39,0	-57,3	-35,4	-25,8	-57,9	-20,2	<b>76,6</b>
IL 5-3	-78,5	-31,6	-3,0	3,3	-7,3	-15,0	-38,7	13,9	22,2	-17,1	<b>65,5</b>	-28,3	-50,4	-30,5	-12,1	-51,0	-43,9	-13,1
IL 5-4	-82,1	-26,6	-17,6	-11,4	-29,3	-27,2	-34,8	4,2	5,5	-26,5	<b>58,2</b>	-40,1	-52,5	-38,6	-24,1	-57,5	-32,1	24,6
IL 5-5	-71,3	-25,9	-15,2	-4,5	-22,9	-55,4	-36,3	-18,9	27,2	-33,9	<b>182,0</b>	-36,2	-55,5	8,1	-40,8	-56,5	14,6	-10,3
IL 6-1	-66,4	10,5	-15,9	-19,6	-28,3	-55,0	-28,0	8,1	2,0	-42,8	<b>108,4</b>	-55,1	-65,3	-64,3	-44,4	-42,3	13,1	-38,5
IL 6-2	-62,0	0,0	-20,5	-24,7	-32,7	-68,4	-65,9	-7,9	-29,3	-47,4	<b>74,4</b>	-64,1	-68,8	-58,3	-47,5	-47,6	-0,9	-24,7
IL 6-3	-50,5	8,1	-14,1	-16,5	-20,9	-51,7	-43,9	-24,7	-25,8	-42,7	<b>81,4</b>	-56,3	-63,8	-47,4	-57,5	-41,6	8,2	-33,4
IL 6-4	-83,7	-38,0	1,0	-4,9	-9,9	-29,9	<b>81,8</b>	14,1	13,8	12,0	<b>183,0</b>	27,0	-32,9	49,0	-0,2	-16,4	<b>115,5</b>	-16,7
IL 7-1	-70,8	-58,0	-34,9	-38,0	-18,7	-48,0	-3,1	-30,9	-16,6	-30,1	-44,7	-22,6	-55,7	-78,4	-62,1	-45,6	-78,1	-34,3
IL 7-2	-34,6	-41,9	-30,8	-29,1	-34,7	-61,5	14,5	-27,9	-20,0	-22,7	-47,6	-34,3	-56,2	-72,4	-67,0	-27,1	-79,0	<b>49,0</b>
IL 7-4	-66,9	-47,7	-5,6	5,0	-7,5	-21,3	15,0	-23,9	15,0	-0,4	<b>56,4</b>	-12,1	-34,5	-61,2	-30,0	-31,8	-44,8	-1,4
IL 7-4-1	-52,3	-41,3	27,6	<b>59,8</b>	<b>42,1</b>	-15,5	22,5	-26,8	<b>49,5</b>	36,1	-5,4	15,4	-17,5	10,6	2,8	25,9	-21,4	<b>79,6</b>
IL 8-1	-75,8	-29,3	-9,7	-15,7	-37,2	-61,8	-27,5	-44,2	0,0	-21,7	-36,5	-54,1	-31,2	-31,0	-50,5	-27,2	-73,1	-28,9
IL 8-1-1	-78,5	-61,3	-38,0	-25,4	-46,4	-55,2	-20,5	-49,3	-10,9	-33,8	<b>183,7</b>	-24,3	-44,7	-70,2	-55,7	-63,2	25,1	-10,5
IL 8-2-1	-85,4	-63,2	-43,0	-34,7	-44,9	-50,1	-44,4	-33,7	5,1	-40,6	<b>173,3</b>	-48,8	-54,2	-23,3	-44,8	-65,6	-14,0	-52,4
IL 8-3	-67,7	-49,7	-26,2	0,6	-30,7	-49,2	-38,6	-40,8	4,2	-28,3	<b>186,5</b>	-33,2	-48,5	-21,4	-36,7	-67,2	-31,7	-18,5
IL 8-3-1	-75,0	-50,8	-31,2	-12,5	-39,7	-43,8	-2,4	-16,4	-5,1	-28,0	<b>260,6</b>	-22,7	-14,7	-55,2	-47,3	-66,8	26,9	15,4
IL 9-1	-53,1	-53,4	-30,9	-13,9	-37,0	-100,0	-53,5	5,7	-15,8	-13,4	<b>75,9</b>	-6,0	-16,1	<b>128,6</b>	-30,3	-70,6	-18,4	15,7
IL 9-1-2	-69,2	-48,9	-32,4	-25,1	-38,7	-52,5	-16,7	<b>44,3</b>	51,7	-15,6	<b>133,8</b>	-23,0	<b>289,7</b>	-13,9	-12,0	-63,1	-41,1	16,4
IL 9-1-3	-51,6	-26,6	6,2	44,0	-6,2	-100,0	<b>50,4</b>	26,7	<b>75,5</b>	21,6	<b>157,0</b>	11,4	-25,0	-42,1	12,6	-47,9	-10,5	33,0
IL 9-2-5	-65,0	-34,3	-5,2	-5,4	-14,5	-48,6	-33,3	-27,2	35,7	-20,5	6,5	-53,6	-60,9	-11,3	-21,1	-40,1	-86,6	-9,7
IL 9-3	-74,2	-62,8	-39,3	-20,8	-26,2	-49,4	-25,3	-38,0	1,8	-27,7	27,3	-42,3	-53,4	-54,0	-51,8	-42,2	-32,5	-2,5
IL 9-3-1	-60,7	-44,5	-5,4	19,2	11,1	-80,6	8,6	-4,2	<b>40,7</b>	-3,5	<b>47,9</b>	-11,9	-30,3	-22,3	-26,7	-39,0	-45,0	<b>96,3</b>
IL 9-3-2	-82,9	-46,2	-14,0	7,6	-8,2	-100,0	17,6	13,2	<b>83,5</b>	-10,0	<b>117,2</b>	-7,5	-33,9	-44,4	-15,2	-58,9	-17,6	29,7
IL 10-1	-64,7	-25,1	3,9	3,1	-9,2	-3,2	4,4	-13,4	<b>37,9</b>	-6,1	<b>114,9</b>	-16,8	-33,7	24,4	-14,3	-39,3	0,1	-10,8
IL 10-1-1	-51,5	-20,3	-2,4	-4,8	-25,0	23,0	5,7	-3,0	<b>62,4</b>	-16,0	35,2	-28,5	-45,2	-7,9	-30,4	-9,5	-2,9	33,6
IL 10-2	-21,0	-7,0	2,5	3,2	-18,0	10,7	-10,9	-9,1	<b>70,3</b>	-0,4	<b>134,2</b>	11,2	-28,9	29,9	50,0	19,2	-11,2	<b>141,8</b>
IL 10-2-2	-53,4	-15,9	8,0	17,2	-6,5	18,3	7,4	7,9	<b>90,9</b>	3,3	89,1	-12,0	-25,6	13,3	-10,1	-8,3	-61,3	<b>56,5</b>
IL 10-3	-68,8	-18,0	-1,0	-1,4	-24,3	20,3	18,8	-38,9	<b>85,5</b>	-0,8	<b>285,7</b>	-18,3	-34,8	-25,7	-26,0	-29,6	-19,1	<b>51,2</b>
IL 11-1	-24,5	-9,9	8,4	1,6	-19,2	-2,5	8,1	-8,1	<b>62,2</b>	-15,3	33,9	-39,5	-52,6	-48,4	-50,9	-8,0	-49,9	27,5
IL 11-2	-31,4	-22,8	-10,7	-25,7	-35,8	-34,3	-19,4	-43,7	-17,6	-22,0	<b>76,2</b>	-63,7	-53,5	-43,4	-61,8	-10,8	-7,5	6,9
IL 11-4-1	-61,7	-10,7	<b>37,2</b>	27,9	-2,5	47,9	<b>77,6</b>	-24,4	<b>50,2</b>	1,1	-19,4	-23,7	-17,3	-16,3	-39,6	-1,4	-59,9	<b>197,0</b>
IL 12-1	-28,1	-12,6	2,4	28,8	0,5	<b>60,8</b>	<b>81,4</b>	-37,9	<b>40,0</b>	-9,8	-3,2	-25,4	-0,9	-12,6	-47,1	-21,7	-63,0	<b>225,9</b>
IL 12-1-1	-41,3	-85,9	<b>32,5</b>	<b>92,6</b>	18,9	<b>135,1</b>	<b>113,3</b>	-8,8	30,1	19,9	17,5	27,9	<b>47,9</b>	<b>211,4</b>	-34,9	-4,5	-56,8	<b>218,6</b>
IL 12-3-1	-56,6	-24,9	-15,9	-24,8	-39,2	-4,1	<b>46,5</b>	-20,1	8,3	-21,1	-41,3	-41,8	-51,0	<b>99,3</b>	-50,6	-35,4	-60,8	<b>51,8</b>
IL 12-4	-49,8	-6,5	2,8	3,6	-14,5	-9,6	33,3	-20,1	<b>77,3</b>	-16,9	-13,3	-33,0	-39,1	<b>42,7</b>	-38,0	-42,4	-58,0	<b>283,5</b>
IL 12-4-1	-57,2	-8,2	10,5	11,9	-16,6	16,3	<b>75,9</b>	2,1	<b>47,5</b>	-9,8	-43,4	-32,4	-38,3	7,0	-18,5	-39,2	-55,9	28,0

**Tabella 4. Differenza espressa in percentuale tra il contenuto degli elementi per ogni IL e quello degli stessi nella cv. M82 in piante trattate.**

Il contenuto degli elementi è stato determinato mediante analisi ICP-MS su 4 repliche biologiche.

In grassetto sono riportati i valori superiori al 30% indicativi della presenza di QTL sulla porzione introgressa del cromosoma.

Genotipo	ELEMENTI																		
	Na	Mg	Ca	Sr	Ba	V	Cr	Mo	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Cd	Al	Pb	As	
IL 1-1	-23,3	-36,6	-63,0	-55,4	-35,8	78,3	54,9	-23,7	6,5	43,4	-64,7	-30,7	0,0	-31,4	-74,5	257,8	-79,6	-16,9	
IL 1-1-3	9,9	-56,3	-66,1	-60,1	-41,2	44,2	80,4	-18,3	-30,1	1,3	-84,7	-41,4	22,4	-30,9	-66,9	82,7	-73,3	-39,7	
IL 1-2	-62,5	-43,2	-53,4	-47,2	-37,4	47,6	-8,5	-33,6	9,7	-10,7	-83,9	-45,3	-11,8	-47,6	-76,0	24,1	280,6	-46,2	
IL 1-4	-60,7	-26,1	-54,4	-49,3	-35,9	73,5	16,8	-7,2	10,6	16,0	-79,1	-51,3	-25,3	-44,6	-78,9	79,6	-88,4	-43,1	
IL 1-4-18	50,3	-30,7	-46,9	-42,9	-37,9	61,9	321,9	-20,7	-7,0	15,1	-78,9	-19,3	15,8	-14,1	-7,7	139,2	7,7	-13,3	
IL 2-1	19,4	18,1	-9,0	-7,0	12,6	12,9	381,3	11,0	77,5	32,1	-68,5	-9,0	62,8	22,9	0,0	11,1	338,0	13,1	
IL 2-1-1	-50,1	-30,4	-59,3	-44,5	-32,3	-67,3	383,4	-25,2	23,0	-21,3	-65,8	-5,2	54,4	-15,2	30,3	-42,3	118,3	-5,0	
IL 2-2	14,8	-41,3	-71,1	-62,5	-46,4	-32,9	312,9	-16,8	-37,4	-49,6	-72,1	-29,2	7,7	-1,8	-31,8	-26,7	-87,3	85,0	
IL 2-3	106,6	8,5	-29,6	-21,1	-40,4	64,6	2507,1	33,0	93,7	77,1	-80,7	356,0	334,0	116,6	315,1	-3,0	337,6	15,9	
IL 2-4	-41,7	1,6	-27,4	-16,9	-22,6	34,2	78,0	-2,7	28,5	48,9	-41,9	-11,9	0,2	-10,6	-53,5	-5,3	-93,0	-26,9	
IL 2-5	-1,4	-16,5	-49,8	-49,0	-45,2	-15,4	60,0	-12,9	-8,5	4,4	-49,8	75,9	18,6	-15,7	-45,9	-36,5	123,4	-52,1	
IL 2-6-5	-5,3	10,4	-42,5	-33,3	-26,9	6,8	1242,6	37,6	40,4	-8,9	97,6	127,9	-3,5	22,8	143,8	58,1	-43,4	23,8	
IL 3-1	-4,8	-28,4	-45,0	-44,2	-36,6	12,8	909,0	-18,2	31,1	-7,0	-4,2	68,1	70,0	10,2	102,2	11,2	-35,6	-16,5	
IL 3-2	46,7	-27,7	-50,0	-34,0	-22,8	31,0	195,1	9,9	35,2	40,7	-69,9	35,1	24,1	45,8	-41,0	-1,5	-88,1	-70,4	
IL 3-5	-54,1	-39,0	-75,6	-62,7	-49,3	-48,0	41,8	-58,4	-29,7	-26,6	-76,5	-55,4	14,6	-33,8	-49,4	-30,7	1226,3	-72,7	
IL 4-1	-6,2	-22,6	-42,8	-25,5	7,6	68,5	101,2	-19,6	24,1	28,8	-14,6	-56,5	60,0	13,7	-65,3	-16,8	97,1	-38,2	
IL 4-1-1	-50,2	-36,5	-44,9	-25,5	-20,7	33,5	244,6	-7,1	55,9	23,4	-32,4	-2,9	83,6	62,9	-26,0	-14,2	107,4	11,6	
IL 4-2	-49,1	-58,5	-66,8	-57,5	-47,2	-32,8	191,0	-22,5	-37,8	-27,5	-47,8	-17,6	7,7	2,8	-7,9	-52,3	-35,5	-70,9	
IL 4-3	62,6	-38,9	-67,3	-66,4	-52,9	-14,7	737,6	-34,0	-16,7	-17,3	-63,2	41,6	72,3	-7,5	83,0	57,5	1534,2	-31,8	
IL 4-3-2	-23,4	-29,1	-53,0	-47,8	-28,7	-50,1	35,6	-34,1	0,7	-4,7	-67,3	-59,8	10,5	-25,0	-64,6	52,6	-79,0	-43,0	
IL 4-4	-27,5	-42,7	-54,4	-53,5	-33,8	-39,5	120,1	-31,8	-13,0	-10,2	-79,8	-63,2	-29,0	-54,8	-71,2	63,7	11,9	-44,0	
IL 5-1	9,5	-18,7	-44,3	-27,7	-29,3	81,9	91,0	15,4	34,1	25,9	-54,5	-33,8	11,1	2,3	-62,7	10,8	763,0	-35,3	
IL 5-2	25,8	19,3	-13,4	-9,9	-13,6	31,8	1919,0	29,1	110,4	50,3	-36,8	180,3	206,6	81,9	215,5	25,6	1124,5	27,3	
IL 5-3	7,2	-34,6	-69,8	-71,0	-64,9	-47,9	517,6	-24,9	-51,5	-37,2	173,0	-12,0	86,3	-20,2	42,1	17,0	-44,3	-43,5	
IL 5-4	30,8	6,6	-48,0	-47,5	-41,0	-4,8	190,3	69,1	11,0	23,0	363,1	55,3	152,2	27,3	-38,6	69,4	39,3	-28,9	
IL 5-5	-9,9	-5,1	-37,6	-27,8	-22,7	-0,5	209,7	22,0	-1,2	7,1	80,4	-1,3	12,7	5,2	-32,0	57,9	-40,3	10,2	
IL 6-1	9,9	-11,6	-38,5	-24,8	-36,3	22,5	177,8	15,7	31,5	-4,4	-66,5	-11,9	39,1	9,0	-39,1	49,0	-68,5	-18,3	
IL 6-2	83,8	-30,0	-50,2	-45,8	-21,0	0,7	345,3	-8,6	29,7	10,3	-79,7	-0,1	7,2	-5,7	-59,8	151,4	-62,3	-41,9	
IL 6-3	36,4	-33,1	-48,9	-45,3	-17,5	-29,1	61,5	-34,8	8,0	3,2	-72,9	-41,5	-32,5	-25,6	-56,8	97,7	156,8	-45,5	
IL 6-4	1,3	-44,0	-52,4	-46,6	-31,2	193,1	158,0	-24,0	-8,8	7,2	-78,9	-37,7	-36,2	8,8	-60,6	134,8	-39,4	-11,4	
IL 7-1	-30,4	-59,5	-70,7	-63,5	-63,8	-1,1	14,1	-50,9	-39,8	-29,3	-36,3	-56,2	-22,0	-59,6	-76,1	-39,9	-62,8	-56,9	
IL 7-3	-28,0	-63,3	-71,1	-61,7	-60,4	7,9	-14,4	-57,0	-57,2	-28,6	-51,4	-30,0	-17,1	-36,4	-62,0	-52,5	629,2	17,3	
IL 7-4	233,6	-46,8	-48,7	-41,4	-27,2	13,0	881,0	-39,6	3,2	21,6	-63,6	83,5	78,8	37,2	127,4	142,6	-42,3	-19,1	
IL 7-4-1	85,1	-65,4	-57,3	-51,8	-44,3	-59,4	17,6	-38,9	-20,3	2,3	-64,2	-30,4	-23,7	51,6	-34,1	85,1	-76,0	7,4	
IL 8-1	-41,1	-52,3	-50,3	-46,2	-36,3	-58,9	69,1	-39,4	59,2	12,6	-63,8	-47,6	-18,3	-6,1	-60,3	51,6	-61,9	-24,3	
IL 8-1-1	-13,0	-17,3	-43,0	-26,1	-26,9	26,4	193,5	-39,7	132,5	25,2	-28,1	-13,6	6,3	-7,2	-10,8	-20,5	391,4	-4,0	
IL 8-2-1	-33,8	-18,7	-44,4	-29,3	-24,9	64,9	343,0	-20,6	80,8	30,5	-64,0	38,8	104,1	31,7	112,4	-2,3	-28,1	-47,2	
IL 8-3	-11,5	-0,9	-36,1	-14,4	-24,3	19,6	365,7	3,1	74,4	27,3	-63,1	10,8	35,0	14,7	9,9	-27,3	335,0	-3,3	
IL 8-3-1	90,4	22,7	-30,7	-19,6	-23,2	117,7	179,3	-4,6	116,3	30,4	-48,7	-39,0	38,8	11,4	-23,7	-13,8	-12,0	26,7	
IL 9-1	60,9	-29,3	-54,1	-54,4	-52,8	44,6	63,6	-25,5	32,0	-15,7	-45,0	-49,0	14,2	-16,6	-45,4	-34,3	-49,9	-24,7	
IL 9-1-2	60,3	-25,8	-53,0	-57,0	-50,6	16,3	118,4	-36,7	36,0	-18,6	-51,0	-36,2	16,6	15,0	-69,6	-16,4	-33,7	-27,6	
IL 9-1-3	96,6	-3,6	-42,9	-51,2	-41,2	9,2	130,6	-19,8	72,6	3,9	15,4	18,9	49,8	23,5	2,5	-18,9	102,4	55,9	
IL 9-2-5	-26,5	-41,9	-64,6	-80,5	-59,3	-44,7	61,2	-35,6	-2,1	-16,6	-51,9	-58,1	20,9	45,2	-81,5	-1,6	-23,6	-47,2	
IL 9-3	-26,8	-68,1	-62,9	-60,5	-50,2	-51,4	105,5	-42,9	-30,1	-8,2	-40,2	-1,5	73,4	42,1	12,3	37,7	-29,0	26,2	
IL 9-3-1	15,0	-38,1	-34,2	-19,2	-2,2	-14,2	393,0	-4,3	25,0	52,9	-48,9	-2,9	115,7	17,6	23,9	124,8	621,7	53,3	
IL 9-3-2	136,4	-9,4	-19,0	-11,0	-4,5	15,1	500,2	-13,5	72,1	30,5	-15,6	16,8	68,4	11,3	33,8	-3,6	349,7	-4,2	
IL 10-1	26,4	-18,6	-46,6	-44,1	-40,8	7,8	204,8	-45,8	-5,7	-3,1	-64,7	-8,8	18,2	-16,1	-28,5	-9,8	500,5	-39,2	
IL 10-1-1	154,0	-8,2	-44,0	-34,9	-29,5	29,7	45,2	-13,0	58,9	25,0	-70,6	-12,1	-7,6	-10,9	-18,4	16,8	-25,7	-12,2	
IL 10-2	-39,6	-21,0	-53,6	-50,1	-46,3	-45,2	124,4	-48,2	55,1	-11,2	-83,3	-25,0	51,7	-42,1	-26,2	-22,5	-77,7	12,5	
IL 10-2-2	131,4	23,4	-16,6	-1,9	-5,2	103,4	628,8	42,8	146,4	53,8	-43,3	37,7	127,7	52,1	95,0	-22,0	39,1	32,6	
IL 10-3	103,3	4,5	-54,4	-50,9	-40,7	-5,5	257,7	10,5	-32,3	-11,9	-65,8	-54,1	-15,2	-41,6	-58,3	-26,4	65,5	-35,7	
IL 11-1	266,6	-6,4	-57,4	-52,4	-45,2	-10,1	117,9	-50,7	-17,1	-22,8	-84,0	-44,0	-32,7	-13,6	-36,9	-45,3	543,4	-22,3	
IL 11-2	83,8	14,7	-39,2	-31,0	-17,3	1,0	-4,1	-2,0	-3,4	-5,8	-63,5	-35,8	2,9	-30,8	-72,9	0,6	7,0	9,6	
IL 11-3	606,4	12,1	4,7	8,7	-45,9	47,6	116,6	-42,7	-27,3	68,8	-32,6	54,1	4,3	-10,0	106,0	30,9	113,2	266,2	
IL 11-4-1	214,4	-20,5	-34,7	-2,2	3,4	82,8	604,3	-10,9	86,7	48,9	-49,1	115,5	108,0	118,0	378,4	-2,2	192,2	117,5	
IL 12-1	186,9	-26,6	-32,5	-8,7	17,1	111,6	143,2	-44,4	29,9	47,3	-14,9	52,6	119,4	35,5	70,7	1,5	33,6	51,2	
IL 12-1-1	254,2	-13,6	-13,4	1,8	5,2	77,9	411,7	-36,9	-3,5	19,3	13,3	62,2	56,5	48,4	129,3	19,0	-37,3	184,4	
IL 12-3-1	104,0	-13,1	-32,4	-34,8	-33,6	9,2	68,0	-31,4	-17,6	6,4	-55,6	-9,1	3,5	-27,9	-38,9	9,1	-51,0	-13,1	
IL 12-4	109,0	-19,9	-49,6	-57,2	-45,9	2,6	74,4	-29,0	-41,7	-26,9	-15,4	14,7	74,5	-2,2	-41,4	-17,1	-28,5	18,8	
IL 12-4-1	124,4	-18,1	-33,5	-38,7	-26,0	33,8	-6,6	-6,6	22,3	-13,1	-10,5	-18,5	-11,2	-16,2	-16,5	6,1	-26,6	21,1	

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Anke M. (2004). Vanadium - an element both essential and toxic to plants, animals and humans?. - An R Acad Nac Farm 70: 961. 999.
- Bai Y., Lindhout P. (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? Annals of Botany 100: 1085-1094.
- Bargagli R. (1998). Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 1-21.
- Baxter C.J., Sabar M., Quick P.W., Sweetlove L.J. (2005). Comparison of changes in fruit gene expression in tomato introgression lines provides evidence of genome-wide transcriptional changes and reveals links to mapped QTLs and described traits. Journal of Experimental Botany 56:1591-1604.
- Baxter I., Hermans C., Lahner B., Yakubova E., Tikhonova M., Verbruggen N., Chao D., Salt D. E. (2012). Biodiversity of Mineral Nutrient and Trace Element Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One. 2012;7(4):e35121. doi: 10.1371/journal.pone.0035121. Epub 2012 Apr 27.
- Baxter I., Hosmani P.S., Rus A., Lahner B., Borevitz J.O., Muthukumar B., Mickelbart M.V., Schreiber L., Franke R.B., Salt D.E. (2009b). Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. PLoS Genet. 2009 May; 5(5): e1000492. Published online 2009 May 22. doi: 10.1371/journal.pgen.1000492
- Baxter I., (2009). Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. Current Opinion in Plant Biology 2009, 12:381. 386
- Baxter I.R., Vitek O., Lahner B., Muthukumar B., Borghi M., Morrissey J., Guerinot M.L., Salt D.E. (2008). The leaf ionome as a multivariable system to detect a plant's physiological status. Proc Natl Acad Sci USA, 105:12081-12086.
- Beebe S., Gonzalez A.V., Rengifo J. (2000). Research on trace minerals in the common bean. Food Nutr Bull, 21:387. 391

- Beecher G.R. (1997). Nutrient content of tomatoes and tomato products. Proc Soc Exp Biol Med, 218: 98-100.
- Bekaert S., et al. (2008). Folate biofortification in food plants. Trends Plants Sci, 13:28 . 35.
- Beutner S., Bloedorn B., Frixel S., Blanco I.H., Hoffman T., Martin H. (2001). Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of  $\beta$ -carotene in antioxidant functions. J. Sci. Food Agric., 81:559. 568.
- Beyersmann D., and Hatwing A. (2008). Carcinogenic metal compound: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch. Toxicol., 82: 493-512.
- Bose J., Babourina O., Rengel Z. (2011). Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plants. Journal of Experimental Botany, 62 (7): 2251. 2264.
- Briat J.F., Curie C., Gaymard F. (2007). Iron utilization and metabolism in plants. Current Opinion in Plant Biology, 10: 276. 282.
- Buchet J.P., Lauwerys R., Roels H., Bernard A., Bruaux P., Claeys F., et al. (1990) Renal effects of cadmium body burden of the general population. Lancet, 336:699-702.
- Burlò F., Guijarro I., Carbonell-Barrachina A.A., Valero D, Martínez-Sánchez F. (1999). Arsenic species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants. J. Agric. Food Chem., 47: 1247-1253
- Cakmak I., Torun B., Ozturk L., Marschner H., Kalayci M. (1998). Morphological and physiological differences in the response of cereals to zinc deficiency. Euphytica, 100:349. 357
- Cakmak L., Torun A., Millet E., Feldman M., Fahima T., Korol A., Nevo E., Braun H.J., Ozkan H. (2004). *Triticum dicoccoides*: An Important genetic resource for increasing zinc and iron concentration in modern cultivated wheat. Soil Sci. Plant Nutr., 50: 1047-1054.

- Causse M., Duffe P., Gomez M.C., Buret M., Damidaux R., Zamir D., Gur A., Chevalier C., Lemaire-Chamley M., Rothan C. (2004). A genetic map of candidate genes and QTLs involved in tomato fruit size and composition. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1671. 1685
- Chao D.Y., Gable K., Chen M., Baxter I., Dietrich C.R., Cahoon E.B., Guerinot M.L., Lahner B., Lu S., Markham J.E., Morrissey J., Han G., Gupta S.D., Harmon J.M., Jaworski J.G., Dunn T.M., Salt D.E. (2011). Sphingolipids in the Root Play an Important Role in Regulating the Leaf Ionome in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 23: 1061-1081.
- Chapple G., Byrne J.P., (1996). Direct determination of trace metals in sea water using ETV-ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11: 549-553.
- Chen C., Huang D., Liu J. (2009a) Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects *Clean*. 37 (4. 5): 304 . 313
- Chen Z., Shinano T., Ezawa T., Wasaki J., Kimura K., Osaki M., Zhu Y. (2009b). Elemental interconnections in *Lotus japonicus*: a systematic. study of the affects of elements additions on different natural variants. *Soil Sci Plant Nutr*, 55 (1):91-101.
- Christen K. (2001). The arsenic threat worsens. *Environ. Sci. Technol.* 35, 286A. 291A.
- Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212: 475. 486.
- Clemens S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88:1707-1719.
- Conte S.S., Walker E.L. (2011). Transporters Contributing to Iron Trafficking in Plants. *Molecular Plant*, 4 (3): 464. 476
- Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E., Yang L. (2004). The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem. Rev* 104: 849-902

- Dahl S.G., Allain P., Marie P.J., Mauras Y., Boivin G., Ammann P., Tsouderos Y., Delmas P.D., Christiansen C. (2001). Incorporation and Distribution of Strontium in Bone. *Bone* 28(4): 446. 453
- DalCorso G., Farinati S., Maistri S., Furini A. (2008). How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. *J. Integr. Plant Biol.*, 10:1268-1280.
- DalCorso G., Farinati S., Furini A. Regulatory networks of cadmium stress in plants.(2010) *Plant Signaling & Behavior*, 5:6, 663-667
- Di Matteo A., Sacco A., De Stefano R., Frusciante L., Barone A. (2012). Comparative transcriptomic profiling of two tomato lines with different ascorbate content in the fruit. *Biochem Genet*, 50(11-12):908-21.
- Ding D., Li, W., Song G., Qi H., Liu J., Tang J. (2011). Identification of QTLs for arsenic accumulation in maize (*Zea mays* L.) using a RIL population. *Plos ONE* 6:e25646.
- Distelfeld A., Cakmak I., Peleg Z., Ozturk L., Yazici A.M., Budak H. et al. (2007). Multiple QTL-effects of wheat Gpc-B1 locus on grain protein and micronutrient concentrations. *Physiol Plant*, 129:635. 643
- Dorais M., Ehret D.L., Papadopoulos A.P. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochem Rev*, 7:231. 250
- Elan 6000. ICPMS hardware guide. Perkin Elmer Sciex, 1997.
- Epstein E. (1972) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives New York: John Wiley & Sons pp 412
- Eshed Y., Zamir D. (1995). An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTLs. *Genetics*, 141:1147. 1162.
- Farinati S., DalCorso G., Varotto S., Furini A. (2010). The Brassica juncea BjCdR15, an ortholog of Arabidopsis TGA3, is a regulator of cadmium uptake,

transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. *New Phytol* 185: 964-78.

- Finnegan P.M., Chen W. (2012). Arsenic toxicity: the effects on plant metabolism. *Front Physiol*, *Front Physiol*. 2012;3:182. doi: 10.3389/fphys.2012.00182. Epub 2012 Jun 6.
- Foolad M.R. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics*, 1: 1-52.
- Fraga C.G. (2005). Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 235-244.
- Frary A., Göl D., Kele D., Ökmen B Pınar H., 2 va H.Ö. Yemenicio lu A., Do anlar S. (2010). Salt tolerance in *Solanum pennellii*: antioxidant response and related QTL. *BMC Plant Biology*, 10 :58. doi: 10.1186/1471-2229-10-58.
- Frary A., Keles D., Pinar H., Gol D., Dogalar S. (2011). NaCl tolerance in *Lycopersicon pennellii* introgression lines: QTL related to physiological responses. *Biologia Plantarum*, 55 (3): 461-468.
- Fridman E., Carrari F., Liu Y.S., Fernie A., Zamir D. (2004). Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 305: 1786. 1789.
- Frusciante L., Carli P., Ercolano M.R., Pernice R., Di Matteo A., Fogliano V., Pellegrini N. (2007). Antioxidant nutritional quality of tomato. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51: 609. 617.
- Gabbrielli R., Pandolfini T. (1984). Effect of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> on the response to nickel toxicity in a serpentine endemic and nickel-accumulating species, *Physiol. Plant*, 62: 540. 544.
- Gahler S., Otto K., Bohm V. (2003). Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 7962. 7968.

- Gao X., Zou C., Zhang S.E.T.M., Van Der Zee F., Hoffland E. (2005). Tolerance to zinc deficiency in rice correlates zinc uptake and translocation. *Plant Soil*, 278: 253. 261.
- Genc Y., McDonald G.K., Graham R.D. (2002). A soil-based method to screen for zinc efficiency in seedlings and its ability to predict yield responses to zinc. *Aust J Agric Res*, 53:409. 421.
- Genc Y., Verbyla A. P., Torun A. A., Cakmak I., Willsmore K., Wallwork H., McDonald G. K. (2009). Quantitative trait loci analysis of zinc efficiency and grain zinc concentration in wheat using whole genome average interval mapping. *Plant Soil*, 314: 49. 66.
- Ghandilyan A., Ilk N., Hanhart C., Mbengue M., Barboza L., Schat H., Koornneef M., El-Lithy M., Vreugdenhil D., Reymond M et al., (2009). A strong effect of growth medium and organ type on the identification of QTLs for phytate and mineral concentrations in three *Arabidopsis thaliana* RIL populations. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1409-1425.
- Goupil P., Souguir D., Ferjani E., Faure O., Hitmi A., Ledoigt G. (2009). Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *J. Plant Physiol*, 166 (13): 1446-52.
- Graham R.D., Ascher J.S., Hynes S.C. (1992). Selecting zinc efficient cereal genotypes for soils of low zinc status. *Plant Soil*, 146: 241. 250.
- Grusak M.A., Della Penna D. (1999). Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:133-161.
- Guerinot M L, Salt D.E., (2001). Fortified Foods and Phytoremediation. Two Sides of the Same Coin. *Plant Physiology*, 125: 164. 167.
- Guo T., Guoping Zhang G., Zhou M., Wu F., Chen J. (2004). Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Plant and Soil*, 258: 241. 248.

- Hirschi K.D. (2009). Nutrient biofortification of food crops. *Ann Rev Nutr*, 29: 401-421.
- Hirschi K.D., Korenkov V.D., Wilganowski N.L., Wagner G.J. (2000). Expression of *Arabidopsis* CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiology*, 124: 125-134.
- Hoekenga O.A., Maron L.G., Pineros M.A., Cancado G.M.A., Shaff J., Kobayashi Y., Ryan P.R., Dong B., Delhaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H., Kochian L.V. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *PNAS*, 103(25): 9738. 9743.
- Hoekenga O.A., Vision T.J., Shaff J.E., Monforte A.J., Lee G.P., Howell S.H., Kochian L.V. (2003). Identification and characterization of aluminum tolerance loci in *Arabidopsis* (*Landsberg erecta* \_ *columbia*) by Quantitative Trait Locus mapping: a physiologically simple but genetically complex trait. *Plant Physiol* 132, 936. 948.
- Holleman A. F., Wiberg E. (1985) - *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin p.868.
- Jeong J., Guerinot M. L. (2008). Biofortified and bioavailable: The gold standard for plant-based diets. *PNAS*, 105: 6 1777. 1778.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004). Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol*, 136: 3276-83.
- Kanter U., Hauser A., Michalke B., Draxl S., Schaffner A.R. (2010). Caesium and strontium accumulation in shoots of *Arabidopsis thaliana*: genetic and physiological aspects. *Journal of Experimental Botany*, 61 (14): 3995. 4009.
- Kim S.A., Guerinot M.L. (2007). Mining iron: Iron uptake and transport in plants. *FEBS Letters*, 581: 2273. 2280.
- Kochian L. V.(1991). in *Micronutrients in Agriculture* (Eds: J. J. Mortvedt), Soil Science Society of America Madison, WI, pp.251. 270.

- Kuper J., Llamas A., Hecht H.J., Mendel R.R., Schwarz G. (2004). Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. *Nature*, 430: 803-806.
- Kurshunova Y.O., Eide D., Clark W.G., Guerinot M.L., Pakrasi H.B.(1999). The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. *Plant Mol. Biol.*, 40: 37-44.
- Kushi L.H., Lenart E.B., Willet WC. (1995). Health implications of Mediterranean diets in light of contemporary knowledge. 1. Plant foods and dairy products. *Am. J. Clin. Nutr.*, 61: 1407 . 1415.
- Lahner B., Gong J., Mahmoudian M., Smith E.L., Abid K.B., (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology*, 21: 1215. 1221.
- Lasat M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metal- A review of biological mechanisms. *J. Environ Qual.*, 31: 109-120.
- Lee K-R., Kuzukue N., Han J-S., Park J-H., Chang E-Y., Baek E-J., Chang J-S., Friedman. 2004. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2832-2839.
- Li L., Tutone A.F., Drummond R.S., Gardner R.C., Luan S. (2001). A novel family of magnesium transport genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 2761. 2775
- Lippman Z. B., Semel Y., Zamir D. (2007). An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Current Opinion in Genetics & Development*, 17: 545. 552.
- Liu, Y.S., Gur, A., Ronen, G., Causse, M., Damidaux, R., Buret, M., Hirschberg, J., Zamir, D. (2003). There is more to tomato fruit colour than candidate carotenoid genes. *Plant Biotechnol. J.*, 1: 195. 207.
- Lonergan P.F. (2001). Genetic characterization of QTL mapping of zinc nutrition in barley (*Hordeum vulgare* L.). University of Adelaide, South Australia (PhD thesis)
- Lòpez-Millàn A.F., Morales F., Gogorcena Y., Abadía A., Abadía J. (2009). Metabolic responses in iron deficient tomato plants. *Journal of plant Physiology*, 166: 375-384.

- Macek T., Mackova M., Pavlikova D., Szakova J., Truksa M., SinghCundy A., et al. (2002). Accumulation of cadmium by transgenic tobacco. *Acta Biotechnol*, 22: 101-106.
- Marschner H. (1995). *Mineral Nutrition of Higher Plants*. London: Academic. 889 pp. 2nd ed.
- Mayer J.E., Pfeiffer W.H., Beyer P. (2008). Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 166.170 doi: 10.1016/j.pbi.2008.01.007. Epub 2008 Mar 7.
- Meharg A. A., Macnair M. R. (1991). The mechanisms of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv and *Agrostis capillaris* L. *New Phytol.*, 119: 291. 297.
- Mengel K., Kirkby E. A. (2001). *Principles of plant nutrition*. Dordrecht: Kluwer Acad. 849 pp. 5nd ed.
- Miller J.C., Tanksley S.D. (1990) RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theor. Appl. Genet*, 80: 437-448.
- Montaser A., McLean A., Liu H., (1998). *Inductively Coupled Mass Spectrometry* edited by Montaser (capitolo1).
- Morris J., Hawthorne K. M., Hotze T., Abrams S. A., Hirschi K.D. (2008). Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots. *Proc Natl Acad Sci*, 105: 1431. 1435.
- Morrissey J., Baxter I.R., Lee J., Li L., Lahner B., Grotz N., Kaplan J., Salt D.E., Gueriot M.L. (2009). The Ferroportin Metal Efflux Proteins Function in Iron and Cobalt Homeostasis in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21: 3326. 3338.
- Mosa K.A., Kumar K., Chhikara S., McDermott J., Liu Z., Musante C., White J. C., Dhankher O. P. (2012). Members of rice plasma membrane intrinsic proteins subfamily are involved in arsenite permeability and tolerance in plants. *Transgenic Res.* doi: 10.1007/s11248012-9600-8. [Epub ahead of print].

- Nieminen T. M. (2004). Effects of soil copper and nickel on survival and growth of Scots pine. *J. Environ. Monit.* 6: 888. 896.
- Norton G.J., Meher N.M., Williams, P. N., Dasgupta T., Meharg A. A., Price A. H. (2008). Rice-arsenate interactions in hydroponics: a three-gene model for tolerance. *J. Exp. Bot.* 59,2277. 2284.
- Norton G.J., Deacon C.M., Xiong L., Huang S., Meharg A.A., Price A.H. (2010). Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant and Soil* 329: 139-153.
- Ohkama-Ohtsu N., Wasaki J. (2010). Recent Progress in Plant Nutrition Research: Cross-Talk Between Nutrients, Plant Physiology and Soil Microorganisms. *Plant Cell Physiol*, 51(8): 1255. 1264.
- Oller A. R., Costa M., Oberdorster. (1997). Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 143, 152. 166.
- Ozkan H, A., Brandolini A., Torun A., Altintas S., Eker S., Kilian B., Braun H.J., Salamini F., Cakmak I. (2007). Natural variation and identification of microelements content in seeds of Einkorn wheat (*Triticum Monococcum*) *Developments in Plant Breeding*. 12: 455-462.
- Ozkan H., Brandolini A., Torun A., Altintas S., Eker S., Kilian B. et al (2006). Natural variation and identification of microelements content in seeds of Einkorn Wheat (*Triticum monococcum*). In *Proceedings of the 7th International Wheat Conference*, 27 November. 2 December 2005, Mar del Plata, Argentina. pp 455. 462.
- Pellet D., Grunes D., Kochian L. (1995). Organic acid exudation as an aluminum-tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.), *Planta* 196: 788. 795
- Pilon M., Cohu C. M., Ravet K., Abdel-Ghany S. E., Gaymard F. (2009). Essential transition metal homeostasis in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 12 (3): 347. 357.
- Pilon-smits E.A.H., Quinn C.F., TapkenW., Malagoni M., Shiavon M. (2009). Physiological function of beneficial elements. *Curr. Opin. Palnt Biol* 12: 267-274.

- Premendran J., Shilpa K., Ramji S. (2005). Effects of calcium, strontium, and barium on isolated phrenic nerve-diaphragm preparation of rat and their interactions with diltiazem and nifedipine. *Indian J Physiol Pharmacol*, 49(1): 72. 76.
- Puig S., Pennarubia L. (2009). Placing metal micronutrients in context: transport and distribution in plants *Current Opinion in Plant Biology* 12: 299. 306.
- Qin H., Cai Y., Liu Z., Wang G., Wang J., Guo Y., Wang H. (2012). Identification of QTL for zinc and iron concentration in maize kernel and cob. *Euphytica* 187: 345. 358
- Rodushkin I., Ruth T., Klockare D. (1998). Non spectral interferences caused by a saline water matrix in quadruple and high resolution ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 13: 159-166.
- Ronen G., Cohen M., Zamir D., Hirschberg J. (1999). Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down regulated during ripening and is elevated in the mutant Delta. *Plant J.*, 17: 341. 351
- Rosales M. A., Ruiz J.M., Hernandez J., Soriano T., Castilla N., Romero L (2006). Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1545. 1551.
- Rousseaux M. C., Jones C. M., Adams D. (2005). QTL analysis of fruit antioxidants in tomato using *Lycopersicon pennellii* introgression lines. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 1396. 1408.
- Ruffel S., Krouk G., Coruzzi G.M. (2010). A systems view of responses to nutritional cues in arabidopsis: toward a paradigm shift for predictive network modeling. *Plant Physiol*, 152: 445. 452.
- Ryan P. R., Delhaize E., Randall P.J. (1995). Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta* 196: 103. 110.

- Saco D., Martín S., San José P. (2012). Vanadium distribution in roots and leaves of *Phaseolus vulgaris*: morphological and ultrastructural effects. *Biologia Plantarum* DOI10.1007/s10535-012-0133-z
- Salt D.E., Baxter I., Lahner B. (2008) Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu Rev Plant Biology*, 59: 709. 733.
- Sancenon V., Puig S., Mira H., Thiele D. J., Peñarrubia L. (2003). Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 51: 577. 587.
- Schat H., Sharma S.S., Vooijs R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol Plant*, 101: 477-482.
- Schauer N., Semel Y., Balbo I., Steinfath M., Repsilber D., Selbig J., Pleban T., Zamir D., Fernie A.R. (2008). Mode of Inheritance of Primary Metabolic Traits in Tomato. *The Plant Cell*, 20: 509. 523,
- Schauer N., Semel Y., Roessner U., Gur A., Balbo I., Carrari F., Pleban T., Perez-Melis A., Bruedigam C., Kopka J., Willmitzer L., Zamir D., Fernie A.R. (2006). Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. *Nat Biotechnol*, 24: 447. 454.
- Seregin I. V., Kozhevnikova A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.*, 53: 257. 277.
- Siedlecka A. (1995). Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64: 265-272.
- Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., Jain R.k. (2003). Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied. Microbiol. Biotech.*, 61: 405-412.
- Stevens R., Buret M., Duffe P., Garchery C., Baldet P., Rothan C., Causse M. (2007). Candidate genes and quantitative trait loci affecting fruit ascorbic acid content in three tomato populations. *Plant Physiology*, 143:1943. 1953.

- Tanksley S.D., Grandillo S., Fultom T.M., Zamir D., Eshed Y., Petiard V., Lopez J., Beck-Bunn T. (1996). Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92: 213. 224.
- Taylor I.B., (1986). *Biosystematics of the tomato*. J.G. Atherton & j. Rudich (Editors). *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement*. Chapman and Hall. London.
- Tieman D.M., Zeigler M., Schmelz E.A., Taylor M.G., Bliss P., Kirst M., Klee H.J. (2006). Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *Journal of Experimental Botany*, 57: 887. 896.
- Tripathi R.D., Srivastava S., Mishra S., Singh N., Tuli R., Gupta D.K., Maathuis, F. J. M., (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotech.*, 25: 158. 165.
- Vachirapatama N., Jirakiattikul Y., Dicoski G., Townsend A.T., Haddad P.R. (2011). Effect of vanadium on plant growth and its accumulation in plant tissues. *Songklanakar. J. Sci. Technol.*, 33 (3): 255-261.
- Van Eenennaam A.L., Linclon K., Durret T.P., Valentin H.E., Shewmaker C.K., Thorne G.M., Jiang J., Bazis S.R., Levering C.K., Aasen E.D., et al. (2003). Engineering vitamin E content: From Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*, 15: 3007. 3019.
- Welch R. M., Graham R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Exp Botany*, 55 (396): 353-364 .
- White P.J., Broadley M.R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets . iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182: 49. 84
- Williams R.J.P. (2001). Chemical selection of elements by cells. *Coord. Chem. Rev.*, 216 17:583. 95.

- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. & Potrykus, I. (2000) Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287: 303-305.
- Zamir D. (2001). Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nature Reviews Genetics*, 2: 983. 990.
- Zamir D. (2006). Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 12981-12986.
- Zhang Y., Stommel J.R. (2000). 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.*, 100: 368. 375
- Zhang, J., Zhu Y.G., Zeng D.L., Cheng W.D., Qian Q., Duan G. L. (2007). Mapping quantitative trait loci associated with arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytol.*, 177: 350. 356.
- Zhao F.J., McGrath S.P., Meharg A.A. (2010). Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 61: 535. 559.
- Zhao K.Y., Aranzana M.J., Kim S., Lister C., Shindo C., Tang C.L., Toomajian C., Zheng H.G., Dean C., Marjoram P. et al., (2007). An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet.* 2007 January; 3(1): e4. doi: 10.1371/journal.pgen.0030004
- Zhu C., Naqvi S., Gomez-Galera S., Pelacho A.M., Cappel T., Christou P. (2007). Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants. *Trends in Plant Science*, 12: 548-555.
- Zhuang X., Chen J., Shim H., Bai Z. (2007). New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environ. Int.*, 33:406-413.
- Ziegler G., Terauchi A., Becker A., Armstrong P., Hudson K., Baxter I. (2012). Ionomics Screening of Field-Grown Soybeans Identifies Mutants with Altered Seed

Elemental. Composition. The Plant Genome: Published ahead of print 9 Aug. 2012.  
doi: 10.3835/plantgenome2012.07.0012