



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

**SELEZIONE ASSISTITA (MAS) E ANALISI DEI
POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNPs) IN
UNA POPOLAZIONE MAGIC DI POMODORO**

**MARKER ASSISTED SELECTION (MAS) AND SINGLE
NUCLEOTIDIC POLYMORPHISMS ANALYSIS (SNPs) IN
MAGIC POPULATION OF TOMATO**

Tesi di laurea magistrale
di:

Gianmarco Marcelli

Relatore
Chiar.mo Prof.

Roberto Papa

Correlatore

Sara Sestili

Sessione Autunnale

Anno Accademico 2018/2019

INDICE

INTRODUZIONE	1
1.1. Storia: origine e diffusione	1
1.2 Descrizione botanica	4
VARIABILITA' GENETICA	8
MARCATORI GENETICI E INDAGINI MOLECOLARI	13
3.1 Marcatori genetici	13
3.2 Marcatori molecolari	15
3.2.1 CAPS	16
3.2.2 SCAR	17
3.3 Metodiche di indagine molecolare: reazione a catena della polimerasi	18
MIGLIORAMENTO GENETICO DEL POMODORO	21
4.1 Selezione Assistita dai Marcatori (Marker Assisted Selection)	21
4.2 Multiparent Advanced Generation Intercross (MAGIC) population .	23
4.3 Tecniche agronomiche a basso input: dispositivo a lungo termine (MOVE LTE)	25
4.4 Breeding partecipativo	28
SCOPO DELLA TESI	31
MATERIALI E METODI	32
6.1 Materiale vegetale	32
6.2 Schema sperimentale e Breeding partecipativo	34
6.3 Estrazione del DNA	37
6.4 Amplificazione del DNA	38
6.5 Marcatori molecolari	40
6.5.1 Nematodi (Meloidogyne spp.)	40

6.5.2 <i>Pseudomonas syringae</i>	40
6.5.3 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>Radicis-lycopersici</i>	41
6.5.4 <i>Phytophthora infestans</i>	42
6.5.5 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	43
6.5.6 <i>Tomato spotted wilt virus</i>	43
6.5.7 <i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i>	44
6.5.8 <i>Virus del mosaico del pomodoro (ToMV)</i>	44
6.5.9 <i>Ripening inhibitor</i>	45
6.5.10 <i>Habitus</i>	45
6.5.11 <i>Colore</i>	46
6.6 ANALISI SNPs	48
6.6.1 High Resolution Melting (HRM)	48
RISULTATI	51
7.1 <i>Selezione assistita da marcatori</i>	51
7.1.1 <i>Nematodi (Meloydogine incognita)</i>	52
7.1.2 <i>Pseudomonas Syringae</i>	52
7.1.3 <i>Fusarium oxysporum f.sp. Radicis-lycopersici</i>	53
7.1.4 <i>Phytophthora infestans</i>	53
7.1.5 <i>Pyrenocheta lycopersici</i>	54
7.1.6 <i>Tomato spotted wilt virus</i>	55
7.1.7 <i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	55
7.1.8 <i>Tobacco mosaic virus</i>	55
7.2 <i>Piante selezionate in base alle analisi molecolari e al breeding partecipativo</i>	56
7.3 <i>Breeding partecipativo – selezione 2019</i>	62
7.4 <i>Analisi Bioinformatica</i>	66
7.5 <i>Valutazione dei marcatori ottenuti mediante High Resolution Melting (HRM)</i>	66
DISCUSSIONE	70
Conclusioni	75

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1. Storia: origine e diffusione

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*), è una delle colture orticole più importanti e ampiamente coltivata in tutto il mondo (Kumar et al. 2013). Originario dell’America centro-meridionale, fu introdotto in Europa dagli spagnoli, probabilmente durante la prima metà del XVI secolo (Bauchet and Causse, 2012). La presunta origine del pomodoro, tuttora irrisolta, sembra essere il Perù. Il Messico è considerato una delle aree di prima domesticazione del pomodoro a partire da forme selvatiche a bacca tondo-piccola detta anche “cherry”, appartenente alla forma botanica *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*), teoria supportata da evidenze culturali, linguistiche, storiche e genetico molecolari. Dal Messico il pomodoro fu portato in Spagna e da lì si diffuse in tutta Europa. Introdotto in Europa dai conquistadores Spagnoli, agli albori del XVI secolo, con varie denominazioni che prendevano origine dall’azteco *tumate*, il pomodoro coltivato ben presto si diffuse in tutti i Paesi del bacino del Mediterraneo, dove per molto tempo fu considerato esclusivamente come curiosità botanica o come pianta ornamentale (Gould 1983).

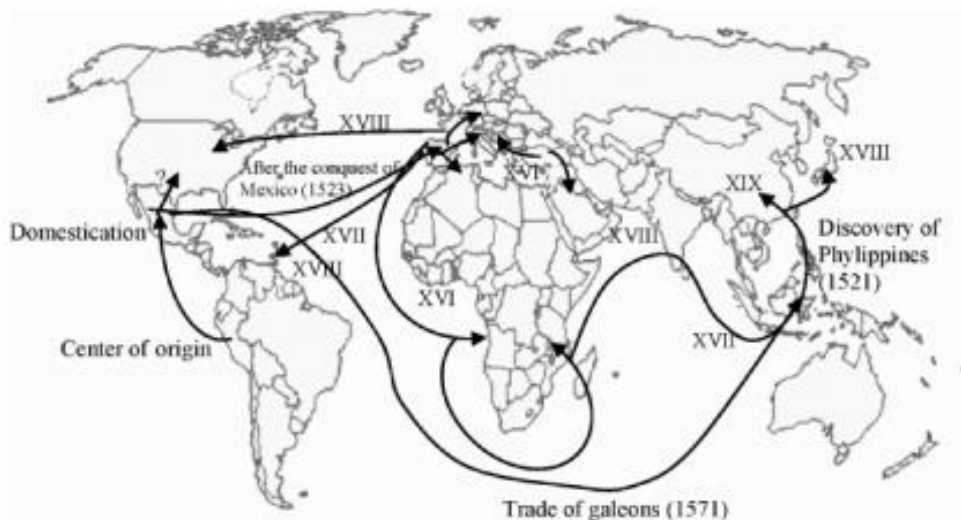


Figura 1 Possibile diffusione del pomodoro a partire dal XVI secolo (Esquinas-Alcázar e Nuez, 1995)

Nel Vecchio Mondo, il pomodoro fu accolto con grande diffidenza a causa della sua associazione con le ben note solanacee tossiche come la belladonna e la mandragora, e per questo fu inizialmente visto come una curiosità botanica utilizzata principalmente per scopi ornamentali, in quanto i suoi frutti erano ritenuti se non velenosi almeno malsani (Soressi et al., 1969; Grandillo et al., 2004). Alla bacca vennero attribuite proprietà afrodisiache, che ne suggerirono l'impiego in pozioni e filtri magici preparati dagli alchimisti del '500 e '600, tanto che nelle diverse lingue europee si ritrovano le espressioni love apple, liebesapfel, pomme d'amour, e pumu d'amuri. Il nome botanico *Lycopersicum*, attribuitogli da Miller, e dal significato di "pesca del lupo", 60testimonia la

diffidenza nei confronti di tale pianta. L'utilizzo del frutto come vegetale commestibile sembra risalire alla fine del 1500. In Italia e in Spagna, il pomodoro fu introdotto nella cucina locale soprattutto delle popolazioni rurali per il consumo fresco o per la preparazione di salse per condimento (Grandillo et al. 2004; Dies and Nuez, 2008). Nel resto d'Europa le cose cambiarono solo con le pestilenze e le carestie dei secoli XVII e XVIII quando, mancando il grano, non solo la plebe ma anche i ricchi dovettero cercare alimenti alternativi. Nel 1820, Robert Gibbon Johnson mangiò un pomodoro davanti ad una folla attonita facendo così crollare l'ormai radicata convinzione che il pomodoro fosse una pianta velenosa. La domesticazione del pomodoro in Europa ha portato alla costituzione di diverse tipologie di pomodoro associati con i nuovi usi e sistemi di coltivazione che hanno portato all'incremento produttivo e qualitativo dei frutti. L'Italia e la Spagna sono state riconosciute come centri secondari di diversificazione e sin dai primi tentativi di coltivazione è stata riscontrata la comparsa di un gran numero di piante di pomodoro aventi frutti di forma e dimensione diversa (Grandillo et al., 2004; Bauchet e Causse, 2012; Mazzucato et al., 2008). Una delle maggiori conseguenze della domesticazione del pomodoro è il cambiamento dello stigma florale da exerto a inserito sul cono staminale, trasformando la specie da allogama facoltativa ad autogama e l'aumento della grandezza dei frutti (Rick, 1974). Questa trasformazione ha

fatto sì che la maggiore parte della variabilità genetica è stata generata entro la specie dando origine essenzialmente a linee pure. Oggi, il pomodoro coltivato, *Solanum lycopersicum* L., è la seconda ortiva più coltivata al mondo, dopo la patata (*Solanum tuberosum* L.). Nel 2017 si è registrata una produzione mondiale di circa 183 milioni di tonnellate, contro gli oltre 390 milioni di tonnellate della patata (FAOSTAT 2017; <http://faostat.fao.org>). La Cina, gli USA, la Turchia, l'India e l'Italia sono i maggiori produttori. Il pomodoro può essere consumato fresco (da mensa) o trasformato per la produzione di pelati, concentrati, passate, polpa, succhi. In Italia si è assistiti ad una netta diversificazione delle tipologie di pomodoro lungo tutto il territorio; al Nord si sono affermati tipologie a bacca grossa e costoluta (Nostrano, Genovese, Riccio di Parma, Ladino di Pannocchia) mentre al Sud si sono affermati tipi allungati (San Marzano, Lampadina, Fiaschetta), ovali (Torrelama, Re Umberto) o a ciliegia.

1.2 Descrizione botanica

Il pomodoro (*Solanum Lycopersicum*) è una pianta erbacea appartenente alla famiglia delle Solanaceae. Nel 1753, Carlo Linneo riconobbe lo stretto legame del pomodoro con il genere *Solanum* da qui il nome di *Solanum Lycopersicum*. Nel 1768 Philip Miller modificò il nome del pomodoro in *Lycopersicon*

esculentum in virtù delle troppe differenze tra il pomodoro e le piante del genere *Solanum*, quali patata e melanzana, Tuttavia, la controversia inerente il nome scientifico, è proseguita per molti anni fino all'avvento delle moderne tecniche di biologia molecolare che hanno permesso di identificare la reale appartenenza del pomodoro al genere *Solanum* attribuendogli ufficialmente il nome di *Solanum lycopersicum* (Peralta and Spooner, 2005). Oltre alle specie coltivate *S. lycopersicum* e alla sua forma selvatica *S. esculentum* var. *cerasiforme*, ci sono otto specie selvatiche correlate, tra cui *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum*, *S. hirsutum* e *S. penelli* (Foolad 2007). Il fusto e le foglie sono pubescenti con corti peli ghiandolari che producono secrezioni aromatiche caratteristiche. Le foglie sono composte, alterne, picciolate e irregolarmente pennatosette. La radice è fittonante la cui profondità di radicamento varia da 0,7 a 1,5 metri. Lo sviluppo del pomodoro è simpoidiale e può essere di tipo determinato o indeterminato. Nelle piante con *habitus* di crescita indeterminato, ogni segmento termina con un'infiorescenza e la crescita continua dalla gemma ascellare più alta producendo fiori e frutti in diversa fase di sviluppo (tendenza poliennale). Nelle piante con un *habitus* di crescita determinato (self pruning), la crescita si arresta ad una fase iniziale di produzione. A questa tipologia appartengono le varietà industriali selezionate per la raccolta meccanizzata con bacche che si

distaccano facilmente e con una buccia particolarmente dura. Il fiore è perfetto, generalmente pentamero, con corolla di colore giallo, ma esistono anche mutanti a corolla bianca (white flower) e giallo-ramato (old gold corolla). Nelle varietà coltivate, stilo e stigma sono generalmente racchiusi dal cono delle antere (stigma inserito). In conseguenza della morfologia florale e della completa autocompatibilità, la fecondazione nel pomodoro è dovuta prevalentemente all'autoimpollinazione; la quota di fecondazione incrociata è di solito molto bassa (<0,5%) anche se in varietà longistilo e in presenza di idonei pronubi può superare il 10%. Il frutto è una bacca di colore rosso a maturazione, sebbene esistano mutazioni o introgressioni di alleli selvatici che conferiscono colore giallo, arancione, marrone e viola. Forma e dimensioni della bacca sono molto variabili. I semi sono piatti, tondeggianti, ruvidi per la presenza di tegumento provvisto di peli, ricchi di lipidi, e di colore di norma giallo paglierino. Esistono anche varianti a seme di colore bruno (brown seed), che è tipico del tegumento seminale delle specie selvatiche affini al pomodoro. Mille semi pesano 2,5-3,5 grammi. L'intero ciclo colturale dura 140-170 giorni a seconda del tipo di sviluppo e delle condizioni di allevamento. L'ambiente di coltivazione ottimale per il pomodoro si riscontra nelle regioni calde e temperato-calde con una temperatura ottimale diurna di 22-26 °C. Temperature

superiori a 30-35°C influiscono negativamente sull'allegagione, sulla formazione del licopene e sulla pigmentazione delle bacche.

Capitolo secondo

VARIABILITA' GENETICA

Il pomodoro è una specie diploide $2n = 2x = 24$. La maggior parte dei geni, più del 90%, risiede nella porzione eucromatica del genoma che corrisponde a circa un quarto del totale; nella parte eterocromatica sono invece conservate soprattutto regioni di DNA contenenti sequenze ripetute non codificanti. Il pomodoro è oggi una delle specie vegetali più studiate a livello genetico e genomico, non solo a causa della sua notevole importanza economica, ma anche perché possiede un genoma relativamente piccolo (950 Mb). Il pomodoro ha subito una notevole diversificazione, a causa della grande varietà di usi e per la sua capacità di adattarsi a diversi ambienti portando alla costituzione delle centinaia di varietà attualmente disponibili. Le prime specie che sono state introdotte in Europa dai conquistatori spagnoli, hanno fornito l'intera base genetica delle cultivar europee e americane, risultando quindi molto simili tra loro. Solo il 5% della variabilità genetica totale, entro il genere *Solanum*, può essere individuata nella specie *S. lycopersicum*, mentre la maggior parte della variabilità genetica cosiddetta "utile" per molte caratteristiche agronomiche si ritrova nelle specie selvatiche (Miller &

Tanksley 1990; Foolad, 2007). Le specie selvatiche di pomodoro rivestono un ruolo fondamentale nel miglioramento delle specie coltivate in quanto donatrici di importanti caratteri a eredità semplice (monogenici) o complessa (oligogenici o poligenici) (Bohn and Tucker 1940; Stevens and Rick 1986). Le specie selvatiche, quali, *S. chilense*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, *S. cheesmaniae* e *S. pimpinellifolium* rappresentano le fonti più importanti dei geni di resistenza. Numerosi studi sono stati condotti con l'obiettivo di caratterizzare le specie selvatiche per importanti caratteri relativi alla qualità ed alla resistenza/tolleranza a stress biotici (Foolad 2007; Grandillo et al. 2011b, Peralta e Spooner 2008). Nel complesso, nel germoplasma selvatico sono state individuate resistenze a 42 agenti patogeni e almeno 20 di queste sono state introgressate con successo nel pomodoro coltivato per l'ottenimento di ibridi commerciali aventi combinazioni indipendenti di geni di resistenza (Zamir et al., 2002; Ji e Scott 2007; Robertson e Labate 2006). La domesticazione prima e il breeding tra varietà coltivate poi, hanno portato ad una forte riduzione della variabilità genetica del pomodoro, mentre una notevole ricchezza di variabilità allelica esiste ancora nel germoplasma selvatico (Ladizinsky 1998). Nel complesso, sono disponibili oltre 75.000 accessioni di germoplasma di *Solanum* sez. *Lycopersicon* mantenute in banche genetiche presenti in oltre 120 paesi di tutto il mondo (Robertson e Labate 2006). Il *Tomato Genetic Resource*

Center (TGRC) all'Università della California, Davis, USA, conserva una ricca collezione di specie selvatiche di pomodoro, mentre il *Plant Genetic Resources Unit* (PGRU) a Ginevra, NY USA quella di specie coltivate. Inoltre, la *Svalbard Global Seed Vault* conserva i semi di oltre 4000 specie di piante, più di 774.601 accessioni, di cui 7.382 di pomodoro coltivato e selvatico (Gascuel et al., 2017).

Il miglioramento genetico del pomodoro trae vantaggi dalla disponibilità di una sufficiente variabilità genetica necessaria per la costituzione di varietà con caratteristiche differenti in termini di destinazione commerciale (da industria, per il mercato del fresco o “multi-purposes”), di produttività e qualità del prodotto (forma, dimensione, colorazione, consistenza, flavour del frutto) e di adattamento ambientale (epoca di raccolta, coltura protetta o in pieno campo, resistenza a stress biotici e abiotici). Nel tempo gli obiettivi dei diversi programmi di breeding sviluppati presso le istituzioni pubbliche e private, hanno subito una evoluzione che ha riguardato l'aumento delle rese, il miglioramento della shelf-life, la resistenza a stress biotici e abiotici, caratteristiche organolettiche e nutrizionali del gusto e della qualità nutrizionale (Bai e Lindhout 2007). Nel corso degli ultimi 50 anni, i metodi tradizionali di miglioramento genetico sono stati integrati con nuove tecnologie (mutagenesi fisica e chimica, la coltura *in vitro*, marcatori molecolari, ingegneria genetica, genomica, nuove tecniche di breeding), capaci di migliorarne l'efficienza

oppure di generare caratteri utili non presenti nelle linee elite. Il pomodoro è oggi una delle specie vegetali più studiate a livello genetico e genomico, sia per la ricerca di base sia applicata, tanto da essere considerata una eccellente “pianta modello”. Ciò è dovuto a molte ragioni, tra cui la facilità di coltura in ambienti diversi, breve ciclo di vita, facilità di impollinazione controllata, specie diploide con un genoma piuttosto piccolo (~0,95 pg / 1C, 950 Mbp), mancanza di duplicazione genica, adattabilità alla coltura *in vitro* (rigenerazione, produzione di aploidi, trasformazione genica), disponibilità di una vasta gamma di mutanti e di risorse genetiche selvatiche e coltivate (Foolad 2007). Il genoma del pomodoro coltivato è della specie selvatica *Solanum pimpinellifolium* sono stati sequenziati e comparati tra loro e con il genoma della patata (*Solanum tuberosum*) da un consorzio internazionale di 10 paesi (Corea, Cina, Regno Unito, India, Paesi Bassi, Francia, Giappone, Spagna, Italia e Stati Uniti) nell'ambito del progetto "International Solanaceae Genome Project", SOL (Tomato Genome Consortium 2012, 2014). I due genomi di pomodoro, coltivato e selvatico, divergono per lo 0,6% corrispondente a circa 5,4 milioni di polimorfismi a singolo nucleotide, mentre divergono per oltre l'8% dal genoma della patata. Il sequenziamento del genoma del pomodoro e delle specie selvatiche è un traguardo molto importante per comprendere le variazioni genetiche avvenute durante la domesticazione e il processo di

breeding (Gao et al., 2019). Inoltre, la disponibilità di un genoma di riferimento del pomodoro permette di studiare in modo approfondito i geni codificanti importanti caratteri e di sviluppare nuovi marcatori funzionali da impiegare sia per la selezione assistita (Marker Assisted Selection, MAS) sia per l'identificazione di nuovi caratteri associati a tratti di interesse agronomico.

Capitolo terzo

MARCATORI GENETICI E INDAGINI MOLECOLARI

3.1 *Marcatori genetici*

I marcatori genetici sono sequenze di DNA polimorfiche (presentano più varianti alleliche che si trovano in un locus specifico all'interno del cromosoma) fra individui differenti. Queste possono trovarsi nell'immediata vicinanza del gene oggetto di selezione, quindi agire come indicatori del carattere di interesse, ma, a volte sono polimorfismi presenti all'interno della sequenza stessa del gene d'interesse; questa situazione è ideale presentando in minor misura inconvenienti dovuti al fenomeno di linkage drag, cioè del 'trascinamento' di caratteri negativi insieme al gene d'interesse. Al momento della meiosi ha luogo il crossing-over (scambio di segmenti di cromosoma tra gli omologhi) per il quale due segmenti di DNA vicini tra loro hanno una maggiore probabilità di segregare rispetto a due segmenti lontani sul cromosoma, quindi si cerca di avvicinare il più possibile il marcatore al sito di interesse, l'ideale sarebbe la sovrapposizione, cioè di avere la sequenza stessa del gene come marcatore. Esistono diversi tipi di marcatori:

- **MARCATORI MORFOLOGICI** (classici o visibili): la sequenza nucleotidica è evidenziata direttamente a livello fenotipico, essi stessi sono caratteri visivi come ad esempio il colore dei fiori o dei frutti, forma o pigmentazione.
- **MARCATORI BIOCHIMICI**: includono varianti alleliche di enzimi chiamate isoenzimi.
- **MARCATORI MOLECOLARI**: che rivelano siti di variazione direttamente a livello del DNA.

L'utilizzo di marcatori morfologici ha portato a diverse problematiche infatti, possono essere influenzati da fattori ambientali, dallo stadio di sviluppo della pianta e dalle interazioni geniche come epistasia (fenomeno per cui l'espressione di un gene è controllata da altri geni) e pleiotropia (fenomeno per il quale un unico allele è in grado di influenzare aspetti multipli del fenotipo). I marcatori biochimici non sono risolutivi in quanto non forniscono un ampio numero di marcatori genetici, essendo poco polimorfici. La soluzione migliore è stata trovata impiegando marcatori molecolari che permettono un esame della variabilità del DNA, non risentendo delle problematiche precedentemente citate.

3.2 Marcatori molecolari

Un marcatore molecolare può essere definito come quel locus genomico, rilevabile con tecniche di biologia molecolare che, in virtù della sua presenza, contraddistingue in modo caratteristico ed inequivocabile il tratto cromosomico. Con l'avvento delle tecnologie basate sui marcatori del DNA nel 1980 (Botstein et al., 1980), molte limitazioni associate ai marcatori morfologici ed agli isozimi sono state superate ed il mappaggio genetico è entrato in una nuova era con la promessa di un significativo aumento dell'efficienza della ricerca associata alla genetica vegetale ed al breeding. Da allora, molte classi di marcatori molecolari basati sulla sequenza del DNA sono state sviluppate in genetica vegetale e utilizzate per svariati studi genetici, dalla mappatura all'analisi QTL dalla filogenesi intra- e interspecifica ai saggi sulla consistenza della diversità genetica. (Weber D, Helentjaris T, 1989). Ai marcatori molecolari appartengono diverse classi:

- A singolo locus, cioè sono visibili variazioni di paia di basi su un unico locus: RFLP e VNRT, basati su ibridazione di tipo SBH (Southern Blot Hybridization) sono tra i primi marcatori molecolari ad essere stati utilizzati (Botstein et al., 1980; Nakamura et al., 1987). Altri tipi come CAPS (Konieczny and Ausubel, 1993), SCAR Sequence (Paran and Michelmore,

1993), SSR (Akkaya et al., 1995), SNP (Jordan and Humphries 1994) vengono sottoposti alla PCR.

- Multi-locus: AFLP (Vos et al., 1995), S-SAP (Waugh et al., 1997), RAPD (Williams et al., 1990), AP-PCR (Welsh and McClelland, 1990) I-SSR (Reddy et al., 2002) Tutti vengono analizzati tramite PCR.

3.2.1 CAPS

I CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) sono dei marcatori molecolari ampiamente usati che combinano tecniche di biologia molecolare (PCR) all'utilizzo di RFLP (Maeda et al., 1990). Il loro utilizzo prevede un'amplificazione mediante PCR del materiale genetico in esame, seguita dalla digestione enzimatica operata da specifici enzimi di restrizione (Konieczny and Ausubel, 1993; Jarvis et al., 1994; Michaels and Amasino, 1998). Il risultato si traduce in un pattern di frammenti di diversa lunghezza, indice di un polimorfismo genico preesistente nei campioni in esame. L'utilizzo di questi marcatori piuttosto che altri presenta alcuni importanti vantaggi. Innanzitutto, sono marcatori che vengono ereditati in maniera codominante (Matsumoto and Tsumura, 2004). Alcuni marcatori classici prevedono l'utilizzo di tecniche di laboratorio piuttosto elaborate per individuare specifiche sequenze di DNA all'interno di miscele complesse mentre per i CAPS l'utilizzo della PCR e la

conseguente amplificazione sequenza-specifica velocizza notevolmente l'analisi. L'altra faccia della medaglia è rappresentata dalle limitazioni nel loro utilizzo, infatti la loro scoperta e il loro utilizzo è possibile solo dove le mutazioni eliminano o creano un sito di restrizione (Akopyanz et al., 1992; Konieczny and Ausubel, 1993). Per ovviare a questo problema è stato individuato un marcatore alternativo chiamato derivative-CAPS (dCAPS) che attraverso l'utilizzo di primer che generano mismatch nel DNA bersaglio si vanno a creare o distruggere dei specifici siti di restrizione utilizzati per l'analisi dei polimorfismi (Michaels and Amasino, 1998; Neff et al., 1998).

3.2.2 SCAR

Gli SCAR sono marcatori molecolari che si basano sull'amplificazione selettiva, mediante PCR, di loci genomici a sequenza nota il cui polimorfismo deriva da mutazioni INDEL (INserzione/DELezione) (Paran and Michelmore, 1993; McDermott et al., 1994). È un metodo estremamente rapido e pratico, in grado di rilevare, specificamente, la presenza di frammenti di diverse dimensioni con un semplice esperimento di PCR. Necessita solamente di un accurato disegno dei primers. L'utilizzo di SCAR rispetto ad altri marcatori (es. RAPD) in indagini molecolari rappresenta un notevole vantaggio poiché sono locus specifici, la loro amplificazione è meno sensibile alle condizioni di

reazione ed infine, ma non meno importante, possono essere convertiti rapidamente in marcatori codominanti. (Paran and Michelmore, 1993).

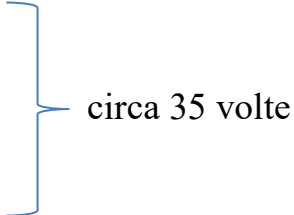
3.3 Metodiche di indagine molecolare: reazione a catena della polimerasi

L'applicazione dei marcatori molecolari è stata molto semplificata da tecniche di biologia molecolare come la PCR (Mullis et al, 1986), sufficientemente efficienti per identificare rapidamente i polimorfismi fra le diverse varianti geniche delle singole varietà. La Reazione a Catena della Polimerasi o PCR è una tecnica che permette l'amplificazione esponenziale di frammenti di DNA sfruttando la capacità di sintesi del DNA dell'enzima DNA-polimerasi che permette una duplicazione di tipo semiconservativa. Questo enzima infatti è in grado di sintetizzare copie multiple di una sequenza specifica di DNA racchiusa tra due brevi tratti di sequenza nota, su cui sono stati disegnati degli inneschi (primers) specifici. La PCR prevede l'alternarsi ciclica di tre fasi:

- Denaturation: fase di denaturazione della doppia elica di DNA a 94/95 °C per 30/60”;
- Annealing: fase in cui i primers si attaccano alle due estremità del frammento da amplificare. Normalmente viene condotta a 55/60° C a seconda del contenuto in G-C dei primers, per 30/60”;

- Extension: fase in cui la DNA polimerasi sintetizza i nuovi filamenti di DNA.

La polimerasi utilizzata nelle reazioni di PCR è stata isolata nei primi anni ottanta dal microrganismo *Thermus aquaticus*, identificato nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti. Questo batterio che quindi vive normalmente a temperature di circa 75°C possiede una DNA polimerasi altamente termostabile, che quindi non viene degradata durante la prima fase di denaturazione del DNA, in cui si deve lavorare a temperature di circa 95°C. Questa DNA polimerasi è stata denominata Taq polimerasi e ha un optimum di attività a 72°C, temperatura a cui normalmente viene condotta la fase di extension. L'esecuzione di queste reazioni cicliche a diverse temperature richiede uno strumento chiamato termociclatore. In cui impostare tempi e temperature che devono essere applicati alla miscela la cui composizione può variare a seconda delle diverse applicazioni specifiche. Il termociclatore nel mio caso è stato impostato nella seguente maniera:

1. 94°C per 3'
 2. 94°C per 1' ogni 1000 basi
 3. T annealing-5°C per 1' ogni 1000 basi
 4. 72°C per 1' ogni 1000 basi
 5. 72°C per 5'
 6. 4°C
- 

Solitamente la PCR viene condotta per circa 35-40 cicli, alla fine dei quali normalmente si ottengono più di un miliardo di copie del tratto di DNA di interesse compreso tra i due primer forward e reverse.

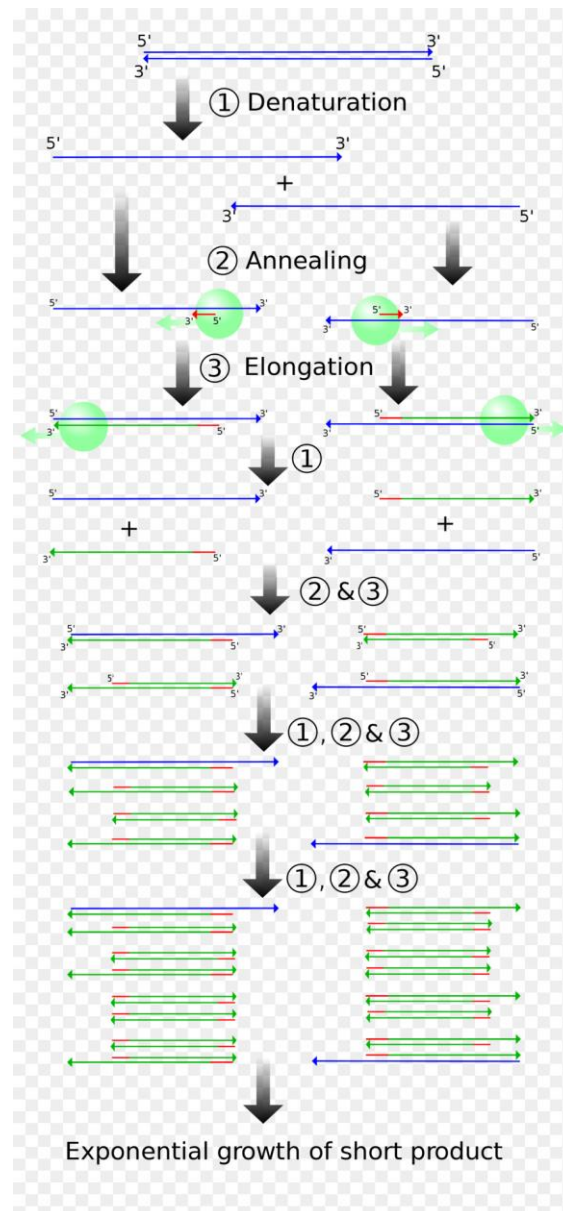


Figura 2 Rappresentazione schematica di una PCR

CAPITOLO QUARTO

MIGLIORAMENTO GENETICO DEL POMODORO

4.1 Selezione Assistita dai Marcatori (Marker Assisted Selection)

La selezione assistita da marcatori è lo strumento più usato e più efficace nel miglioramento genetico vegetale, e implica l'utilizzo di marcatori molecolari a supporto del miglioramento genetico. (Madan M., Suresh N. et al, 1997). La MAS (dall'inglese Marker Assisted Selection), è una tecnica di selezione genetica applicata alle piante e agli animali che permette di migliorare caratteri d'interesse (produttività, resistenza a stress abiotici e biotici). Spesso questi caratteri sono determinati da aree del genoma dette QTL (quantitative trait loci), la cui mappatura e caratterizzazione rappresenta il maggior ostacolo nella MAS (Collard, BCY, Jahufer, MZZ, Brouwer, JB et al. Euphytica, 2005). Con l'avvento delle tecniche 'next generation' l'analisi di tratti semplici e complessi attraverso la MAS è divenuta sempre più semplice e fruibile nei programmi di breeding (Brautigam and Gowik, 2010;). Di grande importanza è anche la scelta dei marcatori più adatti, che andranno selezionati in base a precisi requisiti come: velocità di esecuzione del test diagnostico, un elevato potere discriminante, buona reperibilità, possibilità di essere combinati in un unico

saggio molecolare. Inizialmente si individuano uno o più marcatori associati al carattere d'interesse e si attua la selezione; eventualmente i marcatori possono essere localizzati su una mappa genetica. È molto importante che tra loro ci sia una bassissima percentuale di ricombinazione per evitare che si allontanino nella meiosi; così sarà possibile seguire la segregazione del gene grazie alla presenza del marcatore. I vantaggi nella selezione assistita da marcatori:

- Sono ridotti i tempi della selezione in quanto si possono prelevare i campioni sin dai primi stadi di sviluppo della pianta senza dover aspettare un preciso stadio fenologico in cui si manifesta il carattere in oggetto.
- Assume valore secondario la valutazione fenotipica perché soggetta agli effetti ambientali.
- Facilita il gene pyramiding, cioè la combinazione di più geni di resistenza o geni utili nello stesso genotipo.
- Si evita il trasferimento di geni indesiderati o deleteri (linkage drag), questo è di particolare rilevanza quando sono coinvolte le introgressioni di geni della specie selvatica.
- Agevola la selezione per caratteri a bassa ereditabilità
- È in grado di analizzare tratti specifici dove valutazioni fenotipiche non sono fattibili, ad esempio quando si lavora per resistenze a patogeni da

quarantena per i quali è vietata l'importazione e quindi la realizzazione di screening fenotipici.

4.2 Multiparent Advanced Generation Intercross (MAGIC) population

In pomodoro, il processo di domesticazione nonché l'adattamento a una vasta gamma di condizioni ambientali, hanno portato ad una forte riduzione della diversità genetica molecolare (Blanca et al., 2012; Miller and Tanksley, 1990). Questa mancanza di variabilità genetica nelle specie coltivate ha portato i genetisti a studiare le progenie ottenute da parentali distanti quali le specie selvatiche (Zamir, 2001). Ma il trasferimento di caratteri complessi (resa, qualità e tolleranza agli stress biotici e abiotici) da specie selvatiche è un processo lungo e laborioso che richiede una efficiente procedura di selezione e molte generazioni di re incrocio col parentale coltivato. Inoltre, la natura poligenica di tali caratteri complessi derivante dalla segregazione di numerosi QTL (Quantitative Trait Loci) e la difficoltà di realizzazione degli incroci interspecifici, limitano l'uso dei parentali selvatici come fonte di alleli favorevoli per il miglioramento genetico del pomodoro. Lo sviluppo di popolazioni bi / multi-parentali rappresentano uno strumento di potenziale grande utilità per l'identificazione di QTL, di alleli rari e nello studio della diversità genetica al fine di individuare polimorfismi significativi e individuare

importanti risorse genetiche (Ranc et al., 2012; Xu et al., 2013; Pascual et al., 2016). Una vasta gamma di popolazioni segreganti sono state sviluppate: le linee ricombinanti (RIL), le linee isogeniche (NIL), le linee di introgressione (IL), le linee diplo-aploidi (DHL), le linee mutagenizzate (IML), le linee TILLING (Targeting delle lesioni locali indotte nei genomi) TLs (Varshney et al., 2014; Henikoff et al., 2004), le linee Multiparent Advanced Generation Intercross (MAGIC) (Cavanagh et al., 2008) e le Nested Association Mapping (NAM) (McMullen et al., 2009). Le popolazioni multiparenti di intercross di generazione avanzata (MAGIC) sono state create nella specie modello *Arabidopsis thaliana* (Kover et al., 2009) e in diversi cereali dove hanno permesso l'identificazione di molti caratteri quantitativi (tolleranza a stress biotici e abiotici, per la resa e la qualità) (Bandillo et al., 2013; Huang et al., 2012b). Le popolazioni MAGIC sono state sviluppate in pomodoro (Pascual et al., 2016; Campanelli et al., 2019) fagiolo (Huynh et al., 2018), cece (Gaur et al., 2012), riso (Bandillo et al., 2013), orzo (Sannemann et al., 2015) e grano (Mackay et al., 2014). Lo schema di breeding per la creazione delle popolazioni MAGIC prevede l'incrocio di più linee parentali tra loro. Gli ibridi F1 ottenuti vengono successivamente incrociati tra loro e parallelamente la progenie viene autofecondata fino all'ottenimento delle RIL. L'impiego delle nuove popolazioni, come la MAGIC in combinazione con le tecniche di

genotipizzazione (GWAs), risulta particolarmente utile per identificare polimorfismi putativi nell'ambito di QTL e per la loro mappatura (Pascual et al., 2015; 2016). L'impiego di parentali multipli comporta una maggiore diversità allelica (compresi gli alleli rari) mentre i cicli multipli di interincrocio offrono una maggiore opportunità di ricombinazione con conseguente aumento della variabilità genetica e una maggiore precisione nel posizionare i QTL. La genotipizzazione delle linee RIL ottenute e delle linee parentali, consente lo studio della diversità dei parentali, l'identificazione dei geni che controllano importanti tratti agronomici, l'identificazione di polimorfismi putativi nell'ambito del QTL, il trasferimento di alleli esotici favorevoli nel pool genetico (Pascual et al., 2015).

4.3 Tecniche agronomiche a basso input: dispositivo a lungo termine

(MOVE LTE)

Negli ultimi anni, l'applicazione di pratiche di coltivazione agronomiche intensive quali la lavorazione del terreno in profondità, l'uso inappropriato di fertilizzanti inorganici e la coltura singola, ha contribuito al progressivo peggioramento delle condizioni ambientali e del suolo (deterioramento della fertilità del suolo, perdite di nitrati, inquinamento idrico e compattazione del suolo). Al fine di superare tali problematiche, è necessario combinare buone

pratiche agricole e tecniche di breeding innovativo. Tra le buone pratiche agricole sta assumendo sempre più importanza, sia in termini di area di coltivazione sia per importanza economica, l'agricoltura biologica (Campanelli et al., 2019). L'agricoltura biologica è stata definita dall'International Federation of Organic Agriculture Movements - IFOAM (<https://www.ifoam.bio/>) come un metodo di produzione che sostiene e favorisce il benessere del suolo, dell'ecosistema e delle persone. Anche la Commissione del Codex Alimentarius della FAO/WHO (<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/en/>) ha definito l'agricoltura biologica come un sistema di produzione olistica che promuove e migliora la salute degli agro-ecosistemi, favorisce la biodiversità e le funzioni biologiche del suolo. Essa mira alla realizzazione di sistemi agricoli che, facendo riferimento alle leggi dell'ecologia, siano adattati specificatamente all'ambiente nel quale le attività produttive vengono realizzate (Canali, 2016). Si basa su tecniche conservative che aumentano la sostanza organica del suolo e la sostenibilità ambientale e riducono i rischi ecologici, a causa di un minore utilizzo di prodotti sintetici (Montemurro *et al.*, 2018). Il miglioramento genetico che sfrutta la variazione genetica all'interno del materiale vegetale, è anche uno strumento cruciale per ridurre l'impatto ambientale sui sistemi di coltivazione, fornendo varietà specificamente adattate all'agricoltura biologica

poiché la maggior parte delle varietà disponibili sono state ottenute in condizioni di input elevato (Ceccarelli, S., 2015; Campanelli et al 2019). Un altro approccio di grande potenziale per migliorare la qualità della ricerca nell'agricoltura biologica è l'impiego dei dispositivi sperimentali a lungo termine (LTE) la cui validità è riconosciuta, da diversi anni, dalla comunità scientifica (Köpke, 2006). Nell'ambito degli LTE è possibile studiare pratiche adeguate ai sistemi di coltivazione in biologico, combinando approcci olistici, a lungo termine, scientifici e pratici. In Italia sono presenti diversi dispositivi LTE ma il MOVE LTE è il primo ad essere stato sviluppato, nel 2001 presso il CREA - Centro di ricerca per l'orticoltura e florovivaismo di Monsampolo del Tronto, con l'obiettivo di fornire informazioni sulla sostenibilità agronomica e ambientale della coltivazione biologica (Campanelli e Canali, 2012). Il dispositivo MOVE LTE riproduce un tipico sistema di coltivazione in un'azienda biologica (rotazione delle colture di quattro anni), comprese tutte le colture comuni nell'area (Campanelli e Canali, 2012). Negli anni, il MOVE LTE, rispetto alla produzione agricola convenzionale, ha migliorato la massa microbica del suolo e ha anche aumentato gli artropodi del suolo sia in termini di ricchezza che di biodiversità (Stagnari et al., 2014;). Inoltre, il MOVE LTE ha messo in luce le criticità che ostacolano la diffusione dell'orticoltura quale la mancanza di varietà adatte poiché la maggior parte di quelle disponibili sono

state ottenute in condizioni di input elevato. Il MOVE LTE rappresenta uno strumento importante per ridurre la distanza tra la conoscenza scientifica dell'agricoltura biologica e la sua applicazione, cercando di soddisfare i risultati scientifici sia sulla produzione e lo sviluppo sostenibile sia sulle aspettative pratiche degli agricoltori.

4.4 Breeding partecipativo

Il breeding partecipativo (PPB) prevede il coinvolgimento diretto degli agricoltori nella conduzione delle prove sperimentali, nella scelta dei caratteri agronomici da selezionare e nella selezione in campo (Ceccarelli et al., 2013).

Nato alla fine del secolo scorso per rispondere alle esigenze delle zone marginali, ha acquisito un'importanza sempre crescente nei paesi in via di sviluppo, dove gli agricoltori hanno accettato e adottato con maggiore facilità e rapidità tale sistema di coltivazione rispetto ai metodi tradizionali (Ashby, 2009; Witcombe and Yadavendra, 2014; Ceccarelli, 2015). Il PPB, che unisce la scienza con la conoscenza locale, può essere considerato come un miglioramento genetico evolutivo che tutela e incoraggia la biodiversità e riporta il miglioramento genetico nelle mani degli agricoltori (Ceccarelli, 2009). Il modello del PPB si basa su diversi aspetti:

- a) Allestimento delle prove nelle aziende che adottano le loro pratiche agronomiche
- b) Selezione congiunta tra i ricercatori (breeders) e gli agricoltori
- c) Partecipazione attiva degli agricoltori a tutte le decisioni

L'approccio PPB, in cui gli agricoltori selezionano in modo indipendente la popolazione all'interno dei campi gestiti dai ricercatori e in cui sono coinvolti diversi siti di selezione, contribuisce ad aumentare l'agrobiodiversità e a selezionare varietà adattate in modo specifico al territorio, aumentando la risposta alla selezione e quindi l'efficacia dei programmi di breeding (Campanelli et al., 2015; Annichiarico et al., 2019). Esistono diversi esempi di miglioramento genetico partecipativo in Europa (Inghilterra, Francia Olanda Spagna Portogallo Italia), Stati Uniti e Cina, alcuni dei quali condotti anche in condizioni organiche (Chable et al. 2008; Ceccarelli et al. 2013) Nei paesi industrializzati, il PPB è maggiormente utilizzato nei sistemi di agricoltura biologica per selezionare materiale eterogeneo adatto all'ambiente e al sistema di coltivazione (Annichiarico, 2019). La disponibilità di varietà adatte alla coltivazione in biologico ottenute mediante specifici programmi di breeding, rappresenta una importante risorsa in grado di superare il fattore limitante legato alla minore resa produttiva dell'agricoltura biologica (Campanelli et al., 2015). Questo aspetto è molto importante per il pomodoro, in quanto il suo

intenso miglioramento genetico, ha portato all'ottenimento di un numero elevato di ibridi e alla riduzione del numero di varietà locali tradizionali, apprezzate dai consumatori e generalmente adattate a bassi input agronomici (Campanelli et al., 2019). Un'altra importante sfida del PPB è la sua integrazione con la selezione genomica (GS), che consente di studiare e individuare tratti poligenici complessi (Meuwissen et al., 2001; Heffner et al., 2010). Le tecniche di genotipizzazione come il Genotype by Sequencing (GBS) (Elshire et al., 2011), che producono migliaia di marcatori SNP (polimorfismo a singolo nucleotide) a un costo relativamente basso, hanno facilitato l'applicazione della GS (Annicchiarico 2019). L'impiego delle popolazioni "avanzate" come la MAGIC nei programmi di breeding partecipativo nell'ambito dei sistemi di coltivazione in biologico, rappresenta un importante risorsa per lo sviluppo di nuove cultivar adattate ai sistemi di produzione locali e biologici (Campanelli et al., 2019). In pomodoro il PPB è stato applicato in diversi paesi e ambienti (Campanelli et al., 2013;) ma poco è stato fatto per combinare PPB, MAGIC e tecniche di genotipizzazione al fine di sia di mappare QTL di grande valore agronomico sia di sviluppare nuove cultivar adattate ai sistemi di coltivazione biologici (Campanelli et al., 2019).

Capitolo quinto

SCOPO DELLA TESI

L'attività di ricerca è stata svolta all'interno del progetto Europeo H2020 "Improving the performance of organic agriculture by boosting organic seed and plant breeding efforts across Europe (LIVESEED)". Il progetto riguarda il miglioramento genetico del pomodoro per l'agricoltura biologica, al fine di migliorare la sostenibilità, la performance e la competitività del pomodoro costituendo nuove varietà adatte a sistemi a basso input e a diversi ambienti pedoclimatici. L'attività ha previsto l'impiego di marcatori molecolari per la selezione assistita (MAS) di genotipi della popolazione MAGIC (Multiparental advanced generation intercross) di pomodoro coltivata sul dispositivo MOVE LTE del CREA di Monsampolo del Tronto e in 3 aziende biologiche del Nord, Centro e Sud Italia. Parallelamente è stata avviata l'analisi di marcatori a singolo polimorfismo (SNP) ottenuti dalla genotipizzazione delle linee parentali della popolazione MAGIC al fine di individuare marcatori funzionali associati a tratti di interesse agronomico.

Capitolo sesto

MATERIALI E METODI

6.1 Materiale vegetale

I materiali vegetali analizzati, sono piante G5 derivate dalla popolazione MAGIC di pomodoro sviluppata dalla ISI Sementi spa, incrociando 8 linee parentali, secondo lo schema riportato in Figura 1 (Campanelli et al 2019). I materiali utilizzati sono riportati in tabella 1.

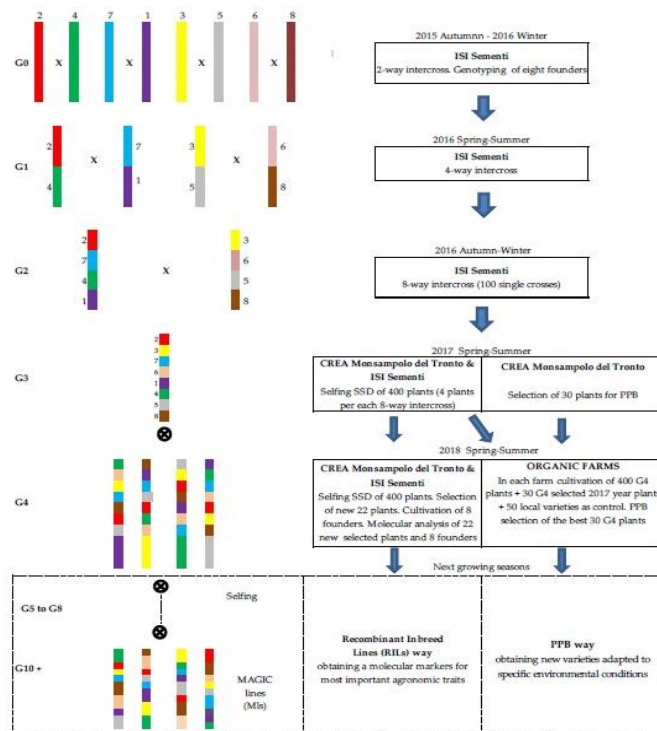


Figura 3 Schema di incroci per lo sviluppo della popolazione MAGIC e flow chart dell'attività di breeding partecipativo; piante 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 = linee ISI; 5 = LA1407 (*S. cheesmaniae*) (Campanelli et al., 2019)

Tabella 1 Materiali utilizzati

Località	Generazione	N° di piante capostipite (famiglie)	N° di piante/capostipite (famiglie)
Padova	G5	34	3
Fermo	G5	31	3
Matera	G5	35	3
CREA - Monsampolo	G5	22	3
Parentali		8	1

I parentali utilizzati sono rappresentati da 7 linee di *Solanum lycopersicum* L, costituite dalla ISI, e la linea LA1407 di *Solanum cheesmaniae* (TRGC). Le linee parentali utilizzate per la creazione della MAGIC, sono state scelte con lo scopo di massimizzare la diversità fenotipica e sulla base di importanti caratteri relativi alla qualità del frutto (consistenza del frutto, colore rosso per la presenza di licopene, uniformità della spalla), alla morfologia della pianta (habitus, trasparenza della foglia), alla tolleranza al freddo e siccità e alla resistenza ai principali patogeni (*Verticillum*, *Fusarium*, *Alternaria*, TSWV, *Phytophthora*) (Tabella 2). L'accessione selvatica di *Solanum cheesmaniae* è stato scelto sia per la sua elevata resistenza a stress abiotici e biotici che per le sue capacità di resa e adattamento. I parentali sono stati genotipizzati mediante la tecnica "Genotyping by sequencing" (GBS) al fine di quantificare la diversità genotipica preesistente e poter procedere con lo schema di incroci.

Tabella 2 Principali caratteristiche delle linee parentali

Parentali	Forma	Peso	DTF ¹	Sp ²	H3 ³	Colore del frutto	Peduncolo	Spalla verde	Ipocotile
ISI 1	Grappolo	70	50	sp/sp	Presente	Rosso	Assente	Assente	Verde chiaro
ISI 2	Rotonda	160	50	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola
ISI 3	Ovale	90	47	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola
ISI 4	Grappolo	80	43	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola
LA1407	Rotonda	5	73	SP/SP	Assente	Arancione	Assente	Presente	Verde
ISI 6	Grappolo	80	36	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola
ISI 7	Allungata	75	46	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola
ISI 8	Rotonda	50	55	sp/sp	Assente	Rosso	Assente	Assente	Viola

¹Giorni alla fioritura; ²Self-pruning; ³capacità di formare ibridi; ⁴lamina fogliare

6.2 Schema sperimentale e Breeding partecipativo

400 piante (4 piante per ogni incrocio) della popolazione MAGIC, allo stadio di sviluppo G3, sono state coltivate presso il CREA di Monsampolo del Tronto sul dispositivo MOVE LTE (Campanelli e Canali, 2012). Il dispositivo MOVE LTE, presso il CREA di Monsampolo del Tronto, copre un'area di circa 2.000 m² e si basa su una rotazione colturale di 4 anni con 4 colture da reddito importanti per il mercato locale e 3 diverse colture di servizio agro-ecologico (ASC), comunemente definite colture di copertura o concime verde (Canali et al., 2015). Il sistema di coltivazione segue le indicazioni dell'agricoltura conservativa. Nella stagione 2017 i ricercatori del CREA hanno scelto 30 piante, in seguito ad una caratterizzazione prettamente visiva che teneva conto di importanti caratteri quali, *habitus*, colore dei frutti, consistenza, forma dei

frutti, produzione, sanità, grado °Brix e pH. Il seme di tutte le 400 piante coltivate è stato raccolto e conservato. Nella stagione 2018, le 400 piante G4 della MAGIC sono state nuovamente coltivate insieme alle 30 piante selezionate l'anno precedente, sia presso il CREA di Monsampolo del Tronto sia presso 3 aziende biologiche localizzate in diverse fasce pedoclimatiche del territorio italiano: la valle del Po in provincia di Padova, (Nord) la costa adriatica in provincia di Fermo (Centro), la costa ionica in provincia di Matera (Sud). Il materiale coltivato al CREA è stato ulteriormente sottoposto a selezione fenotipica visiva da parte dei ricercatori, mentre presso le 3 aziende è stato avviato il breeding partecipativo (PBB). In ogni azienda è stato utilizzato uno schema sperimentale parzialmente replicato (Cullis et al., 2006; Campanelli et al., 2019). Le prove sono state condotte applicando le tecniche di coltivazione locali per la produzione di pomodoro seguendo le pratiche agronomiche indicate dalla legislazione Europea per il biologico (Commission Regulation (EC) No 889/2008. Official Journal of The European Union 18 September 2008). Un team costituito da agricoltori, tecnici e ricercatori, ad ogni prova sperimentale, ha effettuato una selezione visiva individuale, assegnando alle piante il seguente punteggio: 1= per niente soddisfacente, 2= poco soddisfacente, 3= soddisfacente, 4= molto soddisfacente. I parametri considerati nella valutazione sono stati: sviluppo, vigoria, sanità, produzione,

forma del frutto, grandezza del frutto, colore, omogeneità di maturazione, consistenza, sapore, °Brix. Sulla base del punteggio ottenuto, i frutti delle piante migliori sono stati raccolti e i semi sono stati estratti per potere essere piantati l'anno successivo. Le piante selezionate sono state valutate dal punto di vista molecolare al fine di scegliere quelle migliori in termini di resistenza a patogeni, forma e colore dei frutti. Nel 2019 nelle stesse aziende sono state coltivate 20 piante per ogni "pianta capostipite" selezionata sulla base del breeding partecipativo e delle analisi molecolari. Su tale materiale coltivato è stata nuovamente effettuata una selezione visiva da parte degli agricoltori, tecnici e ricercatori al fine di valutare l'omogeneità nell'ambito della famiglia sulla base della rispondenza alla tipologia selezionata l'anno precedente. I parametri considerati ai quali è stato attribuito un punteggio di min = 1, max = 5, sono stati:

- ✓ *sulla parcella*: omogeneità, sanità, vigore vegetativo, fruttificazione (abbondanza e uniformità), giudizio agronomico complessivo sulla parcella
- ✓ *sulla pianta selezionata nell'ambito della parcella*: sviluppo (determinato, semi-determinato, indeterminato), sanità, vigore vegetativo, fruttificazione (abbondanza e uniformità), forma del frutto

(UPOV, figura 6), dimensione del frutto, colore del frutto, scatola, Brix°, peso (gr).












FRUTTO: FORMA IN SEZIONE LONGITUDINALE (UPOV 24) *			
	1 – Appiattita (Campbell 28, Marmande VR)		7 – Cuoriforme (Valenciano)
	2 – Lievemente appiattita (Montfave H 63.5, Montfave H 63.4)		8 – Obovata (Barbara)
	3 – Tondeggiante (Cerise, Moneymaker)		9 – Ovata (Rimone, Rio Grande)
	4 – Rettangolare (Early Mech, Peto Gro)		10 – Piriforme (Europeel)
	5 – Cilindrica (Hypeel 244, Macero II, San Marzano 2)		11 – Obcordata (Margot, 0022)
	6 – Ellittica (Alcaria, Castone)		12 – Pepper shaped

Figura 4 Forma del frutto in sezione longitudinale (UPOV)

6.3 Estrazione del DNA

Il DNA genomico totale è stato estratto partendo da giovani foglie liofilizzate, seguendo il protocollo modificato di Doyle & Doyle (1987). I campioni, a cui sono stati aggiunti 650µl di CTAB e 0.2 % diβ-mercaptoetanololo, sono stati omogeneizzati utilizzando il TissueLyser II® (Quiagen N.V.) e successivamente posti a 65°C per 20 minuti. Dopo il periodo di incubazione

sono stati aggiunti 650 μ l di Cloroformio isoamilico (24:1) e i campioni sono stati posti in un agitatore rotante per 15 minuti e successivamente centrifugati a 13000 rpm per 10 minuti a 4°C. L'RNA è stato rimosso con un trattamento con la RNase-DNase-free incubando la soluzione a 37°C per 30 min e disattivando poi l'enzima ripetendo l'estrazione in cloroformio (come sopra descritto). Il DNA è stato precipitato aggiungendo al surnatante 2/3 di isopropanolo freddo e 1/10 di sodio acetato e ponendo i campioni a -80°C per 10 minuti, successivamente centrifugati a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e centrifugato a 13000 x g per 8 minuti. Il DNA genomico precipitato viene lasciato asciugare per 10 min e poi risospeso in 50 μ l di TE 1X (10 mM di Tris-HCl; 1 mM di EDTA, a pH 8.0). Il DNA estratto è stato quantificato attraverso l'utilizzo dello spettrofotometro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Ma, USA). La qualità del DNA è stata visualizzata attraverso elettroforesi su un gel d'agarosio allo 0,8.

6.4 Amplificazione del DNA

Le reazioni di amplificazione, sono state effettuate in un volume finale di 20 μ l contenente 20 ng di DNA di pomodoro, 1x Colorless GoTaq® Flexi Buffer1, 2,5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 μ M primers e 1,25 U di GoTaq® DNA Polymerase (PROMEGA). I frammenti di amplificazione per i marcatori CAPS

sono stati digeriti mediante gli specifici enzimi di restrizione riportati in Tabella 3.

Tabella 3 Enzimi di restrizione utilizzati

Patogeno/ QTL	ER
<i>Pseudomonas syringae</i>	Rsa I
<i>Fusarium oxysporum f.sp. Radicis lycopersici</i>	Taq I
<i>Phytophthora infestans</i>	Bst NI
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Ban I
Habitus	Scr FI

Le reazioni di digestione sono state effettuate in un volume totale di 50 µl utilizzando 1 µg di prodotto di amplificazione, 1 XNEB buffer, 1 unità dello specifico enzima di restrizione. Le reazioni sono state incubate e disattivate, alle rispettive temperature ottimali e per il tempo richiesto indicati per ogni enzima, secondo i protocolli descritti da NEW ENGLAND BioLabs^{Inc.}

Il DNA amplificato e/o digerito è stato caricato su gel d'agarosio contenente bromuro d'etidio e visualizzato tramite trans-illuminatore UV (Spectroline). Le dimensioni degli ampliconi sono state controllate utilizzando il Ladder 100bp (Nippon Genetics EUROPE) .

6.5 Marcatori molecolari

Nella tabella 4 e 5 sono stati illustrati i marcatori molecolari utilizzati per l'analisi dei materiali vegetali oggetto di selezione.

Di questi, 8 marcatori riguardano la resistenza a patogeni quali:

6.5.1 Nematodi (*Meloidogyne spp.*)

Il gene Mi conferisce resistenza ai nematodi, organismi che attaccano principalmente l'apparato radicale ed inoltre sono potenziali vettori di patologie virali. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 57°C per 1 min, 72°C per 1 min, per 35 cicli; 72°C per 5 minuti. Gli ampliconi sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2%. La digestione con gli enzimi di restrizione produce: una singola banda a 380 bp per i resistenti, una banda a 430 bp per i suscettibili, due bande a 380 bp e 430 bp per gli eterozigoti resistenti (Brenda E. Garcia *et al.* 2007).

6.5.2 *Pseudomonas syringae*

L'agente causale della malattia nota come macchiatura o picchiatura batterica del pomodoro è il batterio *Pseudomonas syringae* pv. tomato. I sintomi della malattia possono manifestarsi su tutti gli organi epigei della

pianta. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 57°C per 30 sec, 72°C per 45 sec per 36 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR è stato visualizzato su un gel di agarosio al 1,5%. Le dimensioni degli ampliconi sono state controllate utilizzando il Ladder 1kb (Promega) per valutare la presenza di bande prima del taglio a 552 bp. L'esito del taglio è stato visualizzato un gel di agarosio al 2%. dopo il taglio si attendono bande a 552bp per i resistenti e bande a 113 e 439 bp per i suscettibili (Yang, W., & Francis, D.M. 2005).

6.5.3 *Fusarium oxysporum*f.sp. *Radicis-lycopersici*

Il fungo del suolo *Fusarium oxysporum* f. sp.*radicis-lycopersici* (FORL) provoca la fusariosi del pomodoro una patologia che porta al marciume radicale. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 51°C per 30 sec, 72°C per 1 min per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR prima del taglio è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 1% e l'altezza delle bande a 1500 bp è determinata dal 1kb Ladder (Promega). L'esito del taglio è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 1%. La presenza di bande a 700 bp, 800 bp, 1200 bp indica la presenza di eterozigoti resistenti mentre i suscettibili presentano bande solo a 800 bp e 1200 bp (Mikel R., Stevens *et al* 1999.)

6.5.4 Phytophthora infestans

La peronospora è una malattia causata da protisti. La malattia rientra in generale nella categoria delle malattie trofiche in quanto causata da organismi parassiti che sottraggono risorse trofiche alla pianta ospite per mezzo di rapporti anatomici e fisiologici abbastanza stretti. Si manifesta, in generale, con depigmentazioni a carico dei tessuti verdi, a cui seguono in genere necrosi più o meno estese. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec, 72°C per 30 sec per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR prima del taglio è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 2%. È stato usato il Ladder 100 bp (Nippon Genetics EUROPE) per valutare la presenza di bande prima del taglio a 500bp. L'esito del taglio è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 2% presenza di una banda a 260 bp indica la presenza di piante resistenti mentre la presenza di bande a 500 bp e 260 bp indica la presenza di eterozigoti resistenti, i suscettibili presentano bande solo a 500 bp (Manisha D., Dhaliwal D. S. *et al* 2108).

6.5.5 Pyrenochaeta lycopersici

Pyrenochaeta lycopersici è un fungo ascomicete parassita delle piante. Provoca la radice suberosa del pomodoro una patologia che porta alla perdita di una parte delle radici e stimola la produzione di radici avventizie da parte delle piante colpite che riescono a sopravvivere ma con un ridotto sviluppo vegetativo ed una minore produzione di frutti. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 1 min, 51°C per 1 min, 72°C per 1 min per 35 cicli; 72°C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati caricati su un gel di agarosio al 2%. È stato usato il Ladder 100bp (Nippon Genetics EUROPE) come marcatore di peso molecolare. La banda attesa intorno a 1000 bp indica la presenza di resistenti mentre l'assenza di banda indica la presenza di suscettibili (Doganlar *et al.*,1998).

6.5.6 Tomato spotted wilt virus

Tomato spotted wilt virus è l'agente eziologico dell'avvizzimento maculato del pomodoro. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 52°C per 30 sec, 72°C per 30 sec per 35 cicli; 72°C per 5 min. I prodotti della PCR sono stati caricati su un gel di agarosio al 2%, È stato usato il Ladder 1kb (Promega). Una singola banda a 541 bp indica i resistenti mentre l'assenza della banda la suscettibilità (Ainong, S. Vierling *et al* 2011).

6.5.7 *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)*

TYLCV è una specie del genere Begomovirus della famiglia Geminiviridae che sul pomodoro induce una malattia nota come accartocciamento fogliare giallo. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 48.6°C per 30 sec, 72°C per 30 sec per 35 cicli; 72°C per 5 min. Gli ampliconi sono stati visualizzati su gel d'agarosio al 2%. Il taglio con gli enzimi di restrizione produce: una banda a 500bp per i resistenti e una banda a 160 bp per i suscettibili (Myluska, C., Xiaohui, Y. *et al* 2014).

6.5.8 *Virus del mosaico del pomodoro (ToMV)*

I sintomi dipendono dall'età della pianta e dal ceppo virale e possono consistere sia in deformazioni che riduzioni del lembo fogliare. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 1 min, 51°C per 1 min, 72°C per 1 min per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio allo 0,5%. È stato usato il Ladder 1 kb (Promega). La presenza di una banda intorno a 3000 bp indica la resistenza mentre la sua assenza indica la suscettibilità nei confronti del patogeno (Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J. *et al* 2004).

6.5.9 Ripening inhibitor

La maturazione dei frutti è un processo naturale che segna il raggiungimento del tasso ottimale di crescita degli stessi e porta una serie di modifiche interne. Il fattore di trascrizione MADS-box RIPENING INHIBITOR (RIN) è un regolatore essenziale nella maturazione dei frutti del pomodoro. Mutazioni a carico di questo gene si ripercuotono negativamente sulla produttività in quanto portano alla produzione di frutti immaturi. Il ciclo di amplificazione utilizzato è il seguente: 94°C per 3 min; 94°C per 30 sec, 55°C per 30 sec, 72°C per 30 sec; per 35 cicli; 72°C per 5 minuti. L'esito della PCR è stato valutato mediante un gel di agarosio al 2%. È stato usato il Ladder 1 kb (Promega). La presenza di una banda a 563 bp indica il genotipo non Rin mentre una banda a 405 bp indica il genotipo mutato rin mentre due bande a 563 bp e 405 bp il genotipo eterozigote (Babak, O. G., Nekrashevich N. A. *et al* 2018).

6.5.10 Habitus

Il gene Sp controlla il tipo di accrescimento del fusto. Può dare origine a 2 fenotipi. Sviluppo indeterminato, cioè il suo meristema mantiene per tutta la

vita la capacità di formare foglie e infiorescenze all'ascella di queste. Sviluppo determinato, ovvero la gemma apicale ad un certo momento si trasforma in infiorescenza e nuovi germogli si sviluppano all'ascella delle foglie precedentemente formate sicché la pianta assume portamento cespuglioso e taglia contenuta. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato: 94°C per 3 min; 94°C per 1 min, 50°C per 1 minuto, 72°C per 1 min per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR (1027 bp) e del taglio, è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 1%. È stato usato il Ladder 1kb (Promega). La presenza dell'allele mutato è indicata da una singola a 1027 bp, mentre l'allele wild type da due bande a 650 bp e 400 bp (Quinet, M., Kinet, J. M. et al 2010).

6.5.11 Colore

Il licopene è il principale pigmento presente all'interno del frutto del pomodoro responsabile della colorazione rossa. La sua produzione e accumulo all'interno del frutto avviene grazie alla via biosintetica dei carotenoidi dove uno degli enzimi limitanti è rappresentato dalla licopene beta-ciclastasi. Questo enzima converte una piccola parte del licopene in beta-carotene. Mutazioni a carico del gene di questo enzima possono portare ad un maggiore o minore conversione del licopene che si traduce in una colorazione più o meno rossa, fino ad arrivare

all'arancio quando l'attività della licopene beta-ciclastasi è massima. L'allele wild type, chiamato Null, conferisce alla bacca una colorazione rossa con bassa conversione di licopene in beta-carotene. La variante allelica C produce piccolissime o nulle quantità di licopene-beta ciclastasi, così le bacche assumono una colorazione rossa intensa. Infine la variante allelica B presenta una mutazione a livello del promotore che aumenta l'affinità per la RNA-polimerasi che si traduce in una grande quantità di licopene-beta ciclastasi. I frutti con questa mutazione assumono una colorazione arancio. L'allele B è dominante nei confronti di Null e C. Null è dominante nei confronti di C. C è recessivo. Il protocollo di amplificazione utilizzato è stato: 94°C per 3 min; 94°C per 15 sec, 51°C per 15 sec, 72°C per 15 sec per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'amplificazione è stata visualizzata su gel di agarosio al 2%. È stato usato il Ladder 1 kb (Promega). La presenza di una banda a 143 bp indica il fenotipo Null, mentre una banda a 152 bp indica il fenotipo B. L'amplificazione per il fenotipo C ha previsto il seguente ciclo: 94°C per 3 min; 94°C per 15 sec, 50°C per 15 sec, 72°C per 15 sec per 35 cicli; 72°C per 5 min. L'esito della PCR è stato valutato mediante la preparazione e l'utilizzo di un gel di agarosio al 2%. È stato usato il Ladder 1 kb (Promega). La presenza di una banda a 140 bp indica il fenotipo Null, mentre una banda a 139 bp suggerisce il fenotipo C. (Babak, O. G., Nekrashevich N. A. *et al* 2018).

6.6 ANALISI SNPs

Un'analisi di Genotyping by Sequencing (GBS), sulle 8 linee parentali della popolazione, ha permesso di identificare un set di marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) che sono stati successivamente filtrati per MAF $<0,05$ attraverso l'uso del software R, ottenendo un set definitivo di 7567 marcatori. La genotipizzazione è stata eseguita dal fornitore di servizi esterno PTP – Parco Tecnologico Padano.

6.6.1 High Resolution Melting (HRM)

Per l'analisi HRM è stato utilizzato il colorante intercalare di terza generazione Eva Green (Biotium Inc, Hayward, CA) e le analisi sono state effettuate mediante il Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Al termine della reazione PCR, per il completamento della HRM, è stata prevista una fase di denaturazione graduale dei campioni, in un intervallo di temperatura compreso tra 60°C - 80°C con un incremento di $0,1^{\circ}\text{C}$. In questa fase sono state acquisite le informazioni utili per il differenziamento dei campioni.

Tabella 4 Marcatore utilizzati per la selezione (patogeni)

Patogeno	Gene	Marker	Tipo di marker	Cromosoma	Primers	Referenza
<i>Meloidogyne incognita</i>	Mi-1-2	Mi-23	Scar	6	5'-TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG-3' 5'-GCATACTATATGGCTTGTTCACCC-3'	1
<i>Pseudomonas syringae</i>	Pto	Pto-1	Caps	5	5'-ATCTACCCACAATGAGCATGAGCTG-3' 5'-GTGCATACTCCAGTTTCAC-3'	2
<i>Fusarium oxysporum f.sp.Radicis-lycopersici</i>	Frl	T1212	Caps	9	5'-AAGTGCTCTAGACAAAAAGACTCC-3' 5'-CCAATGTACAATGGAACCTCGTTGATG-3'	3
<i>Phytophthora infestans</i>	Ph-3	Tg328	Caps	9	5'-GGTGATCTGCTTATAGACTTGGG-3' 5'-AAGGTCTAAAGAAGGCTGGTGC-3'	4
<i>Pyrenocheta lycopersici</i>	Py	Py-1	Caps	3	5'-CTTCTAGTAGTCCAACACAACCTG-3' 5'-CACTTGGTTGATGGATAGTG-3'	5
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Sw-5b	Sw5-2	Scar	9	5'-CGGAACCTGTAACCTGACTG-3' 5'-GAG CTC TCA TCC ATT TTC CG-3'	6
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Ty-2	TY-2-UF7969F2	Caps	11	5'-CGTGCCACCCCTTCATAATA-3' 5'-CCCTTGCGAGGAAAATACAG-3'	7
<i>Tobacco mosaic virus</i>	Tm-2 ²	Tm-2 ²	Scar	9	5'-CTTGACAAGACTGCAGCGAGTGATTGTC-3' 5'-CTACTACACTCACGTTGCTGTGATGCAC-3'	8

1. Brenda E. Garcia *et al.* 2007
2. Yang, W., & Francis, D.M. 2005
3. Mikel R. Stevens *et al* 1994
4. Dubey, M. & Dhaliwal, M. *et al* 2018
5. Doganlar *et al* 1998
6. Ainong, S. Vierling *et al* 2011
7. Miluska, C., Xiaohui, Y. *et al* 2014
8. Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J. *et al* 2004

Tabella 5 Marcatori utilizzati per la selezione (qualità del frutto)

QTLs	Gene	Marker	Tipo di marker	Cromosoma	Primers	References
Ripening inhibitor	Rin	Rin	Scar	5	5'-TGAACAGCCTTTCATCATG-3' 5'-ATCAAAGCATCCATCC GG-3'	1
Habitus	SP	Sp	Caps	6	5'-ACCCCTGGGATGGTAGAGTG-3' 5'-AGTGCCTGGAATGTCTGTGAC-3'	2
Colore	B	Bprom	Scar	6	5'-CTATGTTTGTAGTGCTTGG-3' 5'-GAAAATTGTCATGTGCC-3'	1
Colore	C	Og ^c	Scar	6	5'-TAGGTCTATTTCCAACAA-3' 5'-AAGACTCTGGCTTTGATG-3'	1

1. Babak, O. G., Nekrashevich N. A. *et al* 2018
2. Quinet, M., Kinet, J. M. *et al* 2010

Capitolo settimo

RISULTATI

7.1 Selezione assistita da marcatori

Mediante l'impiego dei marcatori molecolari per stress biotici, sviluppo, maturazione e colore del frutto sono state selezionate le piantine di maggior interesse. Un totale di 123 piante capostipite (G5) e 8 linee parentali sono stati analizzati dal punto di vista molecolare. In particolare, sono state analizzate 22 piante capostipite ottenute dalla prova sperimentale presso il CREA di Monsampolo del Tronto; 35 piante capostipite selezionate dal breeding partecipativo presso l'azienda biologica di Metaponto (Matera); 31 piante capostipite selezionate dal breeding partecipativo presso l'azienda biologica di Massignano (Fermo); 35 piante selezionate dal breeding partecipativo presso l'azienda biologica di Padova (Tabella 1). Per quanto riguarda l'analisi dei marcatori per le principali malattie del pomodoro, sono stati utilizzati 8 marcatori per l'identificazione di: *Meloidogyne incognita* (nematodi), *Pseudomonas Syringae*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, *Phytophthora infestans*, *Pyrenocheta lycopersici*, Tomato spotted wilt virus, Tomato yellow leaf curl virus, Tobacco mosaic virus.

7.1.1 Nematodi (*Meloydogine incognita*)

L'utilizzo del marcatore SCAR Mi-23 (Brenda E. Garcia et al. 2007) ha permesso di individuare il polimorfismo associato alla resistenza ai nematodi. Le piante resistenti presentavano la banda a 380 bp; gli eterozigoti resistenti due bande a 430 bp e 380 bp, mentre le piante suscettibili presentavano la banda singola a 430 bp. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 6 Risultati Mi-23

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	1
Monsampolo	4
Metaponto	12
Fermo	5
Padova	5

7.1.2 *Pseudomonas Syringae*

L'utilizzo del marcatore CAPS Pto-1 (Yang, W., & Francis, D.M. 2005) ha permesso di individuare il polimorfismo che causa resistenza allo stress biotico. Essendo un CAPS dopo la prima amplificazione la valutazione del polimorfismo avviene grazie all'utilizzo dell'esonucleasi di restrizione Rsa I. In seguito al taglio le varianti alleliche sono rappresentate da: banda a 552 bp indica il resistente mentre la presenza di tre bande rispettivamente a 552 bp, 439 bp e 113 bp indica l'eterozigote resistente, infine il suscettibile è individuato dalla presenza di due bande rispettivamente a 439 bp e 113 bp. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 7 Risultati Pto

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	2
Monsampolo	4
Metaponto	16

7.1.3 *Fusarium oxysporum f.sp. Radicis-lycopersici*

L'utilizzo del marcatore CAPS Frl (Mikel R. Stevens *et al* 1994) ha permesso di individuare il polimorfismo che causa resistenza allo stress biotico. Essendo un CAPS dopo la prima amplificazione la valutazione del polimorfismo avviene grazie all'utilizzo dell'esonucleasi di restrizione Taq I. In seguito al taglio le varianti alleliche sono rappresentate da: tre bande rispettivamente a 1200 bp, 800 bp e 700 bp indicano l'eterozigote resistente mentre la presenza di due bande rispettivamente a 800 bp e 700 bp indicano il suscettibile. Tutti i materiali analizzati sono risultati suscettibili al *Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici*

7.1.4 *Phytophthora infestans*

L'utilizzo del marcatore CAPS Tg328 (Dubey, M. & Dhaliwal, M. *et al* 2018) ha permesso di individuare il polimorfismo che causa resistenza allo stress biotico. Essendo un CAPS dopo la prima amplificazione la valutazione del polimorfismo avviene grazie all'utilizzo dell'esonucleasi di restrizione BstN I. In seguito al taglio le varianti alleliche sono rappresentate da: banda a 260 bp

indica il resistente, due bande rispettivamente a 260 bp, 500 bp indicano l'eterozigote resistente, mentre la presenza di una banda a 260 bp indica il suscettibile. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 8 Risultati TG328

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	1
Monsampolo	3
Metaponto	8
Fermo	6
Padova	1

7.1.5 Pyrenocheta lycopersici

L'utilizzo del marcatore Py-1 (Doganlar *et al* 1998) ha permesso di individuare il polimorfismo che conferisce la resistenza allo stress biotico. La variante allelica viene individuata dalla presenza di una banda intorno alle 1000 bp che indica resistenza mentre l'assenza della banda suggerisce suscettibilità. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 9 Risultati Py-1

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	8
Monsampolo	20
Metaponto	29
Fermo	23
Padova	16

7.1.6 *Tomato spotted wilt virus*

L'utilizzo del marcatore Sw-5-2 (Ainong, S. Vierling *et al* 2011) ha permesso di individuare il polimorfismo che conferisce la resistenza allo stress biotico. La variante allelica viene individuata dalla presenza di una banda intorno alle 541 bp che indica resistenza mentre l'assenza della banda suggerisce suscettibilità. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 10 Risultati Sw-5-2

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	6
Monsampolo	9
Metaponto	16
Fermo	25
Padova	8

7.1.7 *Tomato yellow leaf curl virus*

L'utilizzo del marcatore TY2-UF7960F2 (Myluska, C., Xiaohui, Y. *et al* 2014) ha permesso di individuare il polimorfismo che conferisce la resistenza allo stress biotico. La variante allelica viene individuata dalla presenza di una banda intorno alle 160 bp che indica suscettibilità. Tutti i materiali analizzati sono risultati suscettibili.

7.1.8 *Tobacco mosaic virus*

L'utilizzo del marcatore Tm-2 (Lanfermeijer, F. C., Dijkhuis, J. *et al* 2004) ha permesso di individuare il polimorfismo che conferisce la resistenza allo stress

biotico. La variante allelica viene individuata dalla presenza di una banda intorno alle 3000 bp che indica resistenza mentre l'assenza della banda suggerisce suscettibilità. I risultati indicano la presenza di:

Tabella 11 Risultati Tm-2

Provenienza piante	Piante resistenti
Parentali	7
Monsampolo	15
Metaponto	31
Fermo	23
Padova	12

7.2 Piante selezionate in base alle analisi molecolari e al breeding

partecipativo

I risultati del breeding partecipativo condotto nelle tre diverse aziende biologiche hanno permesso di scegliere alcune piante capostipite riportate nelle tabelle 12-13-14-15. Le piante scelte nel primo ciclo di breeding partecipativo nelle 3 diverse aziende Italiane, presentavano caratteri di interesse agronomico molto diversi. In particolare, al nord, le piante avevano un maggiore vigore, abbondanza di produzione e maggioranza di frutti rossi, rispetto a quelli coltivati nel Centro e nel Sud Italia. Le piante selezionate nel Sud Italia hanno mostrato un più elevato grado Brix dei frutti. Le piante evidenziate sono quelle selezionate sulla base dell'analisi molecolare in ogni azienda e località considerata.

Tabella 12 Piante selezionate dalla prova condotta a Metaponto (anno 2018)

P.Ila	Sviluppo	Vigoria	Sanità	Fruttificazione	Forma (UPOV)	Taglia	Colore	Omogeneità maturazione	Consistenza (kg/cm ²)	Scatolatura	°Brix
1.2	indet	3	4	3	3	3	R	5	10,6	3	6,7
3.19	det	3	3	3	5	4	R	4	5,3	3	4,9
4.11	det	3	2	3	8	3	R	4	6,9	2	5,4
4.37	indet	4	4	3	5	3	R	4	5,1	3	6,6
5.1	det	2	4	3	3	3	G	4	6,9	4	5,8
6.2	det	2	3	3	4	3	R	4	6,4	3	5,3
6.15	indet	3	3	3	3	4	R	4	8,7	4	5,5
7.10	indet	3	3	3	5	2	G	4	6,0	3	6,3
8.4	det	4	4	4	9	4	R	4	3,5	3	6,0
8.36	det	3	1	5	3	3	R	2	4,8	3	4,6
9.4	det	2	1	5	4	3	A	4	4,8	3	4,1
9.36	indet	4	4	3	3	3	A	4	5,8	3	5,7
10.4	det	3	3	2	6	2	A	3	5,8	3	6,1
10.6	det	4	3	4	3	3	R	3	9,2	3	6,7
10.13	indet	4	3	4	4	4	R	4	4,4	3	5,2
10.14	det	2	2	4	3	2	R	4	3,9	4	5,5
10.17	det	3	3	3	7	2	R	4	5,5	3	5,2
10.26	indet	3	3	2	3	3	A	4	9,2	4	6,2
10.37	indet	3	3	3	3	5	R	2	5,5	4	6,0
11.15	det	2	2	3	3	3	R	3	7,6	3	4,7
11.38	indet	4	3	3	3	3	R	4	8,3	4	6,7
11.40	det	2	3	3	6	2	G	4	4,6	3	7,1
12.7	det	2	3	3	4	4	R	3	6,0	3	4,6
12.10	det	3	3	3	8	3	R	3	6,9	2	6,5

Tabella 13 Piante selezionate dalla prova condotta a Padova (anno 2018)

Parcella	Sviluppo	Vigoria	Sanità	Fruttificazione	Forma (UPOV)	Taglia	Colore	Omogeneità maturazione	Consistenza (kg/cm ²)	Scatolatura	°Brix
1.1	indet	5	3	3	6	3	A	2	6,9	1	5,3
3.2	indet	4	2	4	4	4	R	3	5,5	2	4,3
3.25	indet	5	4	5	6	3	R	4	5,3	3	5,3
4.1	indet	3	2	3	3	2	R	3	9,9	3	5,6
4.10	indet	4	3	5	3	3	R	3	5,8	3	5,1
5.8	indet	4	4	2	3	2	R	3	5,1	2	5,8
5.10	det	4	5	5	5	4	R	4	5,3	3	4,9
5.27	det	3	3	4	4	3	R	3	6,9	3	5,5
5.36	det	4	3	5	4	3	R	5	7,6	3	5,2
6.10	indet	5	4	3	3	3	R	2	5,8	2	5,1
6.17	det	4	4	5	6	2	A	5	5,8	4	3,8
7.7	det	4	4	5	3	4	R	3	6,9	3	5,1
7.11	indet	5	4	3	3	2	R	2	7,8	3	7,0
7.15	det	5	3	4	5	4	R	3	6,2	2	5,8
8.2	indet	5	4	5	3	3	R	4	7,4	4	5,8
8.31	det	4	4	4	5	3	R	4	5,5	3	5,8
8.39	indet	3	3	5	3	4	R	4	5,5	3	7,0
9.22	det	4	3	5	5	3	R	4	5,8	3	5,3
9.30	indet	4	4	5	4	3	R	4	5,8	3	5,4
10.4	indet	4	4	4	3	3	R	3	4,8	3	5,7
10.7	indet	4	3	3	5	4	G	5	6,9	3	5,4
10.29	indet	4	4	4	5	3	R	3	4,8	2	5,0
10.30	indet	4	3	5	5	4	A	2	5,5	2	5,9
11.1	indet	5	4	4	4	3	R	3	7,1	2	5,8

Tabella 14 Piante selezionate prova condotta a Fermo (anno 2018)

Parcella	Sviluppo	Vigoria	Sanità	Fruttificazione	Forma (UPOV)	Taglia	Colore	Omogeneità maturazione	Consistenza (kg/cm ²)	Scatolatura	°Brix
1.10	indet	3	2	2	5	3	R	3	8,7	3	6,2
1.16	indet	3	2	4	3	3	R chiaro	4	6,0	3	6,1
1.25	det	3	3	4	3	2	R	3	5,8	3	6,9
2.34	indet	4	3	4	3	3	R	2	8,3	5	4,5
3.9	indet	4	2	3	6	3	V/Rosa	2	11,5	2	5,0
3.13	indet	3	2	3	6	3	R	3	7,8	3	6,8
3.24	det	3	3	4	3	3	R	2	5,3	3	4,7
3.32	det	3	1	2	3	2	R	1	5,8	3	5,3
3.34	det	2	2	4	6	3	R	3	5,1	3	4
3.35	det	3	2	4	3	2	R	2	5,5	4	4,5
4.23	indet	3	3	4	3	3	A	4	4,6	4	5,0
4.28	det	3	3	3	6	3	R	3	4,6	3	4,4
4.32	det	3	3	4	6	3	R	4	6,0	2	5,1
5.23	indet	2	2	3	3	2	R	4	7,1	2	5,9
5.32	indet	3	3	3	3	2	A	3	6,9	2	5,0
5.39	indet	4	4	3	9	2	R	3	5,3	3	6,4
5.40	indet	4	4	3	3	2	R	4	6,0	3	6,3
6.24	det	3	2	3	6	3	R	4	5,8	3	5,5
6.27	indet	4	4	3	6	3	R	4	4,1	3	7,7
6.33	det	4	4	4	3	3	R	4	6,9	3	6,2
6.40	det	3	3	4	6	3	R	3	4,4	4	6,1
8.23	det	3	3	4	6	4	R	2	7,6	3	5,6
9.31	det	2	3	3	3	4	R	3	4,4	1	4,5
11.14	indet	4	4	4	5	3	R	4	4,4	3	7,5

Tabella 15 piante selezionate prova condotta a Monsampolo (anno 2018)

P.la	Sviluppo	Vigoria	Sanità	Fruttificazione	Forma (UPOV)	Taglia	Colore	Omogeneità maturazione
1.10	indet	3	2	2	9	2	R	2
1.12	det	2	2	3	3	3	R	3
1.23	det	2	2	3	3	2	A	3
1.24	indet	4	3	4	9	3	A	3
4.22	indet	3	3	4	3	2	A	3
4.27		2	3	2	6	3	A	3
4.28	indet	4	4	3	6	3	R	3
5.5	indet	2	2	3	6	2	A	2
5.8	indet	3	3	3	6	3	A	2
5.31	indet	3	3	2	5	4	A	3
5.39	det	3	2	3	3	2	R	3
7.29	det	3	3	4	6	3	A	3
9.5	indet	3	3	3	3	3	R	3
9.6	det	3	4	4	6	3	A	3
9.27	det	3	3	3	9	2	R	3
9.39	det	2	2	3	5	2	A	4
9.40	indet	4	2	3	3	2	A	3
10.3	det	3	3	5	3	2	A	4
10.21	indet	3	3	3	9	4	A	4
10.35	det	4	3	5	9	4	R	5
12.28	det	3	3	5	3	3	A	3

Le analisi molecolari effettuate sulle piante delle 3 diverse località hanno confermato i risultati del breeding partecipativo e hanno portato a selezionare ulteriori piante portanti i caratteri di interesse. I risultati delle analisi molecolari sono riportati nelle tabelle 16-17-18:

Tabella 16 Analisi molecolare delle linee parentali e delle piante coltivate presso il CREA di Monsampolo del Tronto

	Piante	Nematodi	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	TSWV	(ToMV)	RIN	Sp
P a r e n t a l i	ISI 1	X	X		X				X
	ISI 2				X	X	X		
	ISI 3				X	X	X		
	<i>S.cheesmanie</i>			X	X	X	X		
	ISI 4				X		X	X	
	ISI 6		X		X	X	X	X	
	ISI 7				X	X	X		X
	ISI 8				X		X		X
M o n s a m p o l o	1.24					X			
	1.12				X	X	X		X
	1.10				X	X	X		
	1.23	X	X	X		X			X
	4.22				X		X		X
	4.27				X		X		X
	4.27	X			X	X	X		
	5.2	X	X		X	X			X
	5.8			X	X		X		X
	5.31				X	X			
	5.39				X	X	X		
	7.29	X			X	X	X		X
	6.29				X		X		
	9.6				X		X		X
	9.5	X		X	X		X		
	9.27				X	X	X		X
	9.39				X		X		X
	9.40								
10.3				X		X		X	
10.21			X		X			X	
10.35					X	X		X	
12.28			X	X	X	X		X	

Tabella 17 Analisi molecolari delle piante coltivate nell'azienda di Metaponto

Piante	Nematodi	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	TSWV	ToMV	RIN	Sp
1.2				X	X	X		X
1.4		X		X	X	X		X
3.19			X	X	X			X
4.7						X		X
4.11	X		X			X	X	X
4.21					X	X	X	
4.37			X		X	X	X	
5.1				X	X	X	X	X
5.8	X			X		X		X
6.2	X			X	X	X		X
6.15	X	X		X	X	X	X	X
7.2	X	X		X		X	X	
7.10	X			X	X	X	X	
8.1						X	X	X
8.3					X	X	X	X
8.4				X			X	X
8.36	X	X	X	X		X	X	X
9.4	X			X		X	X	X
9.36				X		X		
10.4		X		X		X	X	
10.6			X	X		X	X	X
10.13	X			X		X		X
10.14		X		X		X	X	X
10.17	X	X	X	X				X
10.26		X		X	X	X	X	X
10.37				X	X	X	X	X
11.15	X	X	X	X		X	X	X
11.16		X		X	X		X	
11.38		X		X		X	X	X
11.40	X	X		X	X	X	X	X
12.6			X	X		X	X	X
12.7				X		X	X	X
12.10		X		X	X	X	X	X
12.27		X		X		X		X
12.32		X		X		X	X	X

Tabella 18 Analisi molecolare delle piante coltivate nelle località di Fermo e Padova

FERMO					PADOVA					
Piante	Nematodi	<i>Phytophthora infestans</i>	TSWV	ToMV	Piante	Nematodi	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	TSWV	ToMV
1.10			X	X	1.1					
1.16			X	X	3.2			X		X
1.25					3.25					
1.30				X	3.7			X		
2.25			X	X	4.1			X		X
2.34			X	X	4.6					
3.9			X	X	4.10					
3.13		X	X	X	4.31			X		
3.24		X	X		5.8					
3.32				X	5.10					
3.34			X	X	5.20			X	X	
3.35		X	X	X	5.22					
4.23			X	X	5.27	X	X	X	X	X
4.28		X	X	X	5.36	X		X	X	X
4.32			X	X	6.10			X		X
4.40					6.14					X
5.23			X	X	6.17					
5.32	X		X		7.3					
5.39			X	X	7.7					
5.40			X	X	7.15					
6.21	X				8.2			X		
6.27	X		X	X	8.23					
6.33	X	X	X	X	8.31					
6.40			X	X	8.39	X		X		X
8.16			X	X	9.14			X		X
8.23			X	X	9.22			X	X	X
9.6			X	X	9.29					
9.9					9.30					
9.31			X	X	10.1				X	X
11.14			X	X	10.4			X		X
12.26			X	X	10.7					
					10.29	X		X		X
					10.30				X	
					11.1					

Le analisi molecolari delle piante coltivate nell'azienda di Fermo hanno riguardato essenzialmente i marcatori per i nematodi, la *Phytophthora infestans*, la *pyrenocheta lycopersici* e i virus TMWV e ToMV. Tutti i parentali presentavano la resistenza alla *Pyranocheta lycopersici* e la maggior parte avevano anche la resistenza al TSWV e al ToMV. Questi caratteri sono stati ritrovati nella maggior parte delle linee selezionate, a differenza della resistenza

ai nematodi, allo *Pseudomonas syringae*, al RIN e al gene Sp. Inoltre, in 5 piante coltivate a Metaponto è stata osservata la piramidizzazione dei caratteri analizzati rispetto a quelle coltivate a Fermo e a Monsampolo. La resistenza ai nematodi e alla *phytophthora infestans* presente solo in due parentali, è stata trasferita in molte delle piante selezionate. Il colore è stato analizzato mediante HRM in quanto oltre al marcatore riportato in letteratura sono stati utilizzati quelli ottenuti dall'analisi degli SNP dei parentali. I risultati dell'analisi molecolare dimostrano la grande variabilità ancora presente (G5) nelle piante ottenute dalla popolazione MAGIC.

7.3 Breeding partecipativo – selezione 2019

Le piante coltivate nelle aziende biologiche del Nord, Centro e Sud Italia, sono state valutate da un team formato da agricoltori, tecnici e ricercatori. I parametri considerati dagli agricoltori sono stati esclusivamente la sanità, la vigoria, la resa e il frutto. Dall'analisi visiva sono state scelte alcune parcelle delle quali è stata fatta una selezione massale e nell'ambito delle parcelle selezionate sono state scelte alcune piante aventi caratteri interessanti dal punto di vista agronomico.

Tabella 19 Parcelle scelte dalla prova condotta a Metaponto

p.lla	% di omogeneità	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione		Giudizio agronomico sulla p.lla	Selezione	Pianta scelta	Sviluppo	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione					Scatolatura	Bix°	Peso (gr)
				Abbondanza	Uniformità							Abbondanza	Forma UPOV	Dimensione	Colore	Uniformità di maturazione			
1.2	100	3	4	2	3	3	SI												
3.19	50	3	3	3	2	2	NO	6A	semi det	4	3	3	12	3	R	3	2	6,5	50
4.11	25	5	5	2	3	2	NO												
4.37	100	3	5	1	1	1	NO												
5.1*	20	4	4	3	2	2	NO	2B*								3	5	37	
6.2*	65	4	5	3	3	3	SI	1A	det	4	3	4	4	3	R/A	4	2	6,5	44,5
6.15	25	3	5	2	2	2	NO	8A*								2	5,8	62	
7.10*	90	4	5	2	3	2	NO	1A*								3	5,6	76	
7.10*	90	4	5	2	3	2	NO	4B	ind	4	5	3	5	3	G/A	4	3	6,3	34,5
8.4*	90	3	4	3	3	3	SI												
9.36*	45	3	4	3	3	2	NO	5B*								2	6,1	57,5	
9.36*	45	3	4	3	3	2	NO	1B*								2	6,5	52	
10.4*	15	3	3	4	1	2	NO												
10.6*	55	4	4	3	2	2	NO												
10.13*	100	3	3	4	3	3	SI												
10.14*	80	3	3	4	3	3	SI	A6	det	4	3	4	4	3	R	5	4	6,5	43,5
10.17	15	2	4	3	2	2	NO												
10.26*	85	4	4	3	3	3	SI												
11.38*	100	4	5	3	4	4	SI												
11.40	75	4	4	3	2	2	NO	1B	det	5	3	3	4	2	G	4	5,7	32	
11.40	75	4	4	3	2	2	NO	4A*								3	6,4	30	
11.40	75	4	4	3	2	2	NO	10A	det	4	4	4	4	3	R	4	6	41,5	
12.10	100	3	2	5	3	4	SI												
8.36	80	2	2	4	2	2	NO												
9.4	25	2	3	3	2	2	NO	10B	semi det	5	4	4	3	4	A	5	4	4,8	25,5
10.37	95	4	3	3	4	3	SI	5B*								4	6,7	15	
11.15*	25	2	3	3	3	2	NO												
12.7	79	2	2	4	3	2	NO	6A	det	3	3	4	3	3	R	3	4	4,2	32
12.7	79	2	2	4	3	2	NO	9A*								4	4,6	19,5	

Il breeding partecipativo effettuato presso l'azienda biologica di Metaponto portato alla selezione di n. 9 famiglie (1.2; 6.2; 8.4; 10.13; 10.14; 10.26; 10.37; 11.38; 12.10) risultate omogenee e rispondenti ai parametri selettivi considerati l'anno precedente e per le quali è stata effettuata la sola selezione massale. Sulla base delle indicazioni degli agricoltori e dei ricercatori, tra tutte le parcelle selezionate sono state scelte 16 piante. Oltre alle parcelle selezionate sono state scelte le piante della parcella: 3.19; 5.1; 6.15 (2 piante) 7.10; 9.36 (2 piante); 11.40 (2 piante); 9.4; 12.7 (2 piante) che presentavano i caratteri riportati in tabella 19 che presentavano alti punteggi per tutti i caratteri considerati (vigoria, sanità, colore, produttività ecc.).

Tabella 20 Parcelle e piante scelte dalla prova condotta a Fermo

p.lla	% di omogeneità	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione		Giudizio agronomico sulla p.lla	Selezione	Pianta scelta	Sviluppo	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione				Scatolatura	Bix°	Peso (gr)	
				Abbondanza	Uniformità							Abbondanza	Forma UPOV	Dimensione	Colore				Uniformità di maturazione
5.32	70	5	3	4	3	3	SI												
2.34	50	2	2	2	3	2	NO												
3.9	0	2	3	2	2	2	NO	9	indet	3	3	3	6	2	R	2	3	4,8	41,5
3.13	63	3	3	1	3	2	NO												
1.25	21	2	2	3	3	2	NO												
1.16*	53	2	2	3	3	2	NO	15*	det	4	3	3	3	3	R	2	1	4,6	47
1.10	100	1	2	2	3	2	SI												
3.24	35	3	3	2	2	2	NO												
3.32	88	1	2	1	4	2	NO												
3.34*	69	2	2	3	3	3	SI	2*	det	4	3	4	4	3	R	2	2	3	32,5
4.28	94	2	3	3	3	3	SI												
4.23	77	2	3	3	2	3	SI												
3.35	0	2	2	2	2	2	NO												
5.39	36	2	3	2	2	2	NO												
5.40	88	3	2	3	3	3	SI	4	det	3	3	3	3	2	R	4	3	5,1	40
6.24	70	2	2	2	4	3	SI												
5.32	65	2	3	3	3	3	SI	5*	det	3	3	3	3	3	R	4	4	4,9	43
5.23	73	2	3	3	3	3	SI												
4.32	78	3	2	3	3	3	SI												
9.31	21	3	3	2	2	2	NO	14	det	4	3	2	3	3	R	3	4	6,8	71,5
11.14*	28	2	3	2	2	2	NO	2*	semi det	3	3	4	6	2	R	3	2	5,4	57,5
8.23*	18	2	2	3	2	2	NO	12	det	5	3	3	3	3	R	4	1	6	29
								16*	semi det	2	3	4	6	2	R	3	3	6	60,5
6.40	21	2	2	2	2	2	NO	2*	det	3	3	3	8	2	R	2	4	5,2	33,5
6.33	0	1	2	1	2	1	NO												
6.27	13	1	1	1	1	1	NO												

Il breeding partecipativo effettuato presso l'azienda biologica di Fermo ha portato alla selezione di n. 9 famiglie (1.10; 3.34; 4.23; 4.28; 4.32; 5.23; 5.32; 5.40; 6.24) risultate omogenee e rispondenti ai parametri selettivi considerati l'anno precedente e per le quali è stata effettuata la selezione massale. Sulla base delle indicazioni degli agricoltori e dei ricercatori, tra tutte le parcelle selezionate sono state scelte 10 piante che presentavano alti punteggi per tutti i caratteri considerati (vigoria, sanità, colore, produttività ecc.). Oltre a quelle appartenenti alle parcelle selezionate sono state scelte altre piante: 3.9; 1.16; 9.31; 11.14; 8.23 (2 piante); 6.40.

Tabella 21 Parcelle e piante scelte dalla prova condotta a Monsampolo

p.lla	% di omogeneità	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione		Giudizio agronomico sulla p.lla	Selezione	Pianta scelta	Sviluppo	Sanità	Vigore vegetativo	Fruttificazione				Scatolatura	Bix°	Peso (gr)	
				Abbondanza	Uniformità							Abbondanza	Forma UPOV	Dimensione	Colore				Uniformità di maturazione
5.32	70	5	3	4	3	3	SI												
2.34	50	2	2	2	3	2	NO												
3.9	0	2	3	2	2	2	NO	9	indet	3	3	3	6	2	R	2	3	4,8	41,5
3.13	63	3	3	1	3	2	NO												
1.25	21	2	2	3	3	2	NO												
1.16*	53	2	2	3	3	2	NO	15*	det	4	3	3	3	3	R	2	1	4,6	47
1.10	100	1	2	2	3	2	SI												
3.24	35	3	3	2	2	2	NO												
3.32	88	1	2	1	4	2	NO												
3.34*	69	2	2	3	3	3	SI	2*	det	4	3	4	4	3	R	2	2	3	32,5
4.28	94	2	3	3	3	3	SI												
4.23	77	2	3	3	2	3	SI												
3.35	0	2	2	2	2	2	NO												
5.39	36	2	3	2	2	2	NO												
5.40	88	3	2	3	3	3	SI	4	det	3	3	3	3	2	R	4	3	5,1	40
6.24	70	2	2	2	4	3	SI												
5.32	65	2	3	3	3	3	SI	5*	det	3	3	3	3	3	R	4	4	4,9	43
5.23	73	2	3	3	3	3	SI												
4.32	78	3	2	3	3	3	SI												
9.31	21	3	3	2	2	2	NO	14	det	4	3	2	3	3	R	3	4	6,8	71,5
11.14*	28	2	3	2	2	2	NO	2*	semi det	3	3	4	6	2	R	3	2	5,4	57,5
8.23*	18	2	2	3	2	2	NO	12	det	5	3	3	3	3	R	4	1	6	29
								16*	semi det	2	3	4	6	2	R	3	3	6	60,5
6.40	21	2	2	2	2	2	NO	2*	det	3	3	3	8	2	R	2	4	5,2	33,5
6.33	0	1	2	1	2	1	NO												
6.27	13	1	1	1	1	1	NO												

Presso il CREA di Monsampolo il team di ricercatori ha selezionato 5 famiglie (12.28; 1.12; 7.29; 9.6; 9.39) e nell'ambito di queste sono state scelte 6 piante (1.23; 9.27; 9.39; 10.3; 10.35; 12.28). In tabella 21 sono riportati i caratteri analizzati dall'analisi molecolare per ogni pianta selezionata. La selezione effettuata a Monsampolo tenendo conto solo della valutazione dei ricercatori è probabilmente risultata più restrittiva delle altre località. Questo dimostra il valido supporto offerto dal breeding partecipativo e quindi delle indicazioni degli agricoltori. Per quanto riguarda l'azienda biologica di Padova i dati non sono disponibili in quanto le condizioni climatiche sono state particolarmente avverse e l'agricoltore non è riuscito a mantenere integre le piante.

7.4 Analisi Bioinformatica

Il sequenziamento dei parentali ha permesso così di quantificare la diversità genotipica preesistente nelle linee parentali per poter così procedere con gli incroci. I 4 incroci iniziali sono stati effettuati usando il protocollo utilizzato da Pasqual et al. 2015

7.5 Valutazione dei marcatori ottenuti mediante High Resolution Melting

(HRM)

L'analisi dei 7567 nuovi SNP prodotti dalla genotipizzazione dei parentali, ha permesso l'identificazione di n. 3 nuovi marcatori PCR che sono stati validati mediante l'analisi HRM. I campioni analizzati sono riportati in tabella 22:

Tabella 22 Campioni analizzati mediante HRM

N°	PIANTA	Colore	Area di coltivazione (PPB)
1	4.21	arancione	Metaponto
2	4.37	rosso	
3	5.1	giallo	
4	5.8	arancione	
5	6.15	rosso	
6	10.4	arancione	
7	11.40	giallo	
8	5.5	rosso	Monsampolo del Tronto
9	9.5	rosso	
10	5.31	rosso	
17	1.10	rosso	Fermo
18	1.16	rosso	
19	4.23	arancione	
20	5.25	rosso	
21	6.24	rosso	
22	4.20	rosso	parentali
23	S. cheesmaniae	arancione	
24	9.23	rosso	
25	5.1	rosso	
26	10.9	rosso	
27	5.24	rosso	

I primers per la reazione di PCR e analisi HRM sono stati disegnati sulla sequenza di "Lycopersicon esculentum chromoplast-specific lycopene beta-cyclase mRNA, complete cds" (NCBI GenBank: AF254793.1). La mutazione *β beta* su pomodoro è a singolo *locus* parzialmente dominante e determina il colore arancione nel frutto completamente maturo a causa dell'accumulo di β -carotene a spese del licopene. Nel *wild type*, il β -carotene costituisce il 5-10% dei carotenoidi totali della frutta, mentre in Beta è il 45-50% e può superare il 90% in combinazione con il gene modificatore beta (MoB) (Ronen et al., 2000).

In figura 6 è riportata la curva della specie di *S. cheesmaniae* (evidenziata in nero), rispetto ad alcune linee prese in considerazione per l'analisi HRM. Tale identità di sequenza è stata ulteriormente evidenziata nei diversi picchi di melting HRM (Figura). Tra i parentali utilizzati è presente una linea di pomodoro selvatico di *Solanum cheesmaniae* con portamento semi-determinato, dotato di alcune resistenze e l'unico parentale di con frutti di colore arancione.

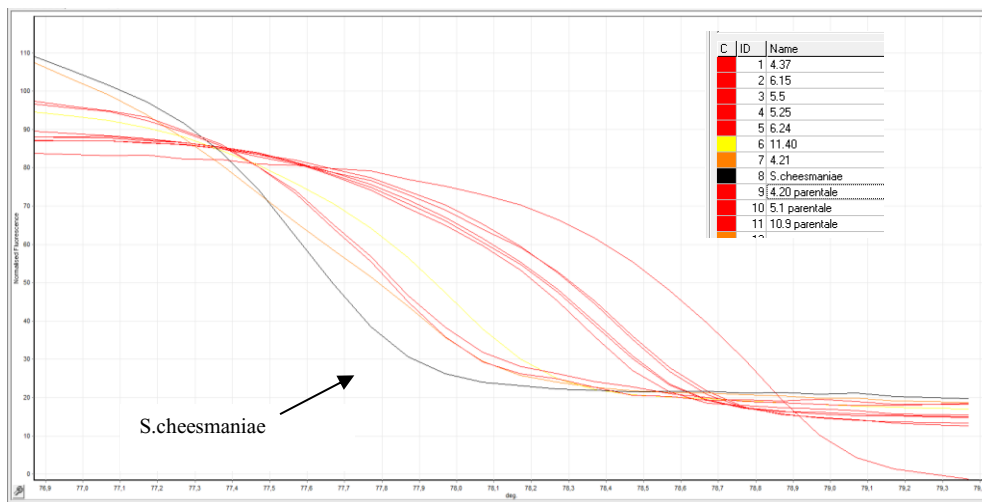


Figura 5. Curve di alcune linee di pomodoro selezionate



Figura 6 Analisi HRM

Le curve di melting ottenute in questa analisi hanno consentito di identificare le differenze e le similitudini genetiche presenti tra i parentali e alcune linee della popolazione MAGIC di colore giallo (11.40) e rosso (4.37; 6.15; 5.5; 5.25; 6.24).

Capitolo ottavo

DISCUSSIONE

Il pomodoro, prodotto di eccellenza sia dal punto di vista economico sia nutrizionale, oltre ad essere una delle piante più coltivate e consumate in tutto il Mondo, rappresenta la coltura simbolo per l'Italia. Questo lavoro è stato finalizzato allo studio della popolazione MAGIC di pomodoro coltivata in biologico e selezionata secondo lo schema del breeding partecipativo al fine di identificare le varietà adattate a diversi ambienti e alle tecniche di coltivazione in biologico. Le popolazioni innovative come la MAGIC sono state create per far fronte alla riduzione di variabilità genetica dovuta alla domesticazione delle specie coltivate (Bauchet et al., 2017). Nella costituzione della popolazione MAGIC la scelta dei parentali è di estrema importanza nel determinare la composizione genetica della popolazione e creare un alto livello di variabilità (Huang et al., 2015). La notevole ricchezza di variabilità allelica presente ancora nel germoplasma selvatico rende tali materiali dei parentali di grande valore per la costituzione della MAGIC. I parentali della popolazione MAGIC di pomodoro utilizzata in questo lavoro, sono stati scelti in base alla presenza di importanti caratteri agronomici quali la resistenza/tolleranza a patogeni e

virus, *habitus*, forma e colore dei frutti. Il pomodoro è stata una delle prime piante coltivate in cui è stata applicata la tecnica della selezione assistita, oggi diventata una tecnica di routine in molti programmi di breeding del pomodoro (Foolad & Panther, 2012). La selezione assistita da marcatori della popolazione MAGIC ha permesso di individuare in modo preciso e mirato quelle piante aventi caratteri di interesse agronomico e utili per lo sviluppo di linee stabili. Sono stati impiegati marcatori basati sulla PCR già noti e strettamente associati a geni di interesse agronomico quale la resistenza alle malattie, *habitus* vegetativo e la qualità dei frutti. Questo tipo di selezione è di grande aiuto sia per il breeder sia per l'agricoltore in quanto fornisce una precoce informazione sulle resistenze a altri caratteri agronomici importanti, in una data popolazione. Lo screening fenotipico delle piante scelte per verificare i risultati dell'analisi molecolare e per convalidare l'associazione (o la mancanza di questi) tra i marcatori e i tratti di interesse, si rende necessario soprattutto nel caso di materiale altamente variabile come quello derivato da una popolazione MAGIC. Per alcuni caratteri come la resistenza alle malattie, la selezione assistita da marcatori risulta più veloce, economica ed efficace della selezione fenotipica (Foolad & Panther, 2012). Nel pomodoro, sono stati identificati e mappati i geni per la resistenza a oltre 35 agenti patogeni, quali fusarium wilt razze 1, 2 e 3, *Phytophthora infestans* (late blight: Ph-3 e Ph-2), verticillium wilt razza 1, *Xanthomonas* (bacterial spot: Rx3 and Rx4), tomato spotted wilt

virus (Sw5), tomato yellow leaf curl virus (Ty1, Ty2, Ty3 and Ty4), e nematodi (Mi). Tuttavia, non tutti i marcatori riportati in letteratura sono facilmente applicabili nei programmi di breeding del pomodoro. La selezione assistita dai marcatori ha permesso di individuare diverse piante per ogni località del Nord, Centro e Sud Italia, che presentavano i caratteri analizzati. In particolare, in alcune piante sono stati amplificati tutti i geni, evidenziando la piramidizzazione di alcuni dei tratti di interesse agronomico analizzati. Questo lavoro necessita di ulteriori approfondimenti al fine di individuare la presenza di ulteriori marcatori ma anche per validare quelli sviluppati dall'analisi dei dati di genotipizzazione dei parentali. L'analisi degli SNP ottenuti dalla genotipizzazione delle linee parentali ha permesso di identificare, anche se solo in modo preliminare, nuovi marcatori molecolari associati al colore dei frutti, confermando la validità dell'approccio bioinformatico adottato. I dati della genotipizzazione dei parentali saranno arricchiti da quelli ottenuti dalla genotipizzazione delle linee più stabili ottenute nei due anni di breeding partecipativo ma anche delle RILs (Recombinant Inbreed Line) che sono state prodotte per Single Seed Descent dalla MAGIC nel corso delle prove svolte presso il CREA di Monsampolo. L'analisi degli SNP ottenuti permetterà di individuare ulteriori nuovi marcatori associati a tratti di interesse agronomico da utilizzare nei programmi di breeding del pomodoro.

Il grande potenziale della popolazione MAGIC è stato sfruttato nell'ambito del breeding partecipativo al fine di individuare varietà adatte alla coltivazione in biologico in diversi ambienti pedo-climatici. Il breeding partecipativo ha permesso di selezionare le piante della MAGIC di pomodoro sulla base delle esigenze del mercato locale e all'ambiente di coltivazione. La selezione fenotipica delle piante scelte anche sulla base dell'analisi molecolare, ha portato all'identificazione delle famiglie le cui piante presentavano un elevato grado di stabilità genetica. L'analisi molecolare, ha confermato la selezione visiva effettuata dal team di agricoltori, tecnici e ricercatori, durante i due anni di breeding partecipativo, confermando il grande supporto offerto dalla selezione assistita nella selezione di una popolazione altamente segregante come la MAGIC. Le piante scelte dal secondo ciclo di selezione partecipata possono essere considerate linee, che seppure non ancora completamente stabili, rappresentano un'importante risorsa genetica sia per i breeders che per gli agricoltori, al fine di affrontare le nuove sfide della coltivazione sostenibile sia per il mercato fresco che per l'industria. L'attività svolta, ha confermato la validità dell'integrazione tra il breeding partecipativo, la selezione assistita da marcatori e le tecniche avanzate di sequenziamento (GBS). Questo approccio rende più efficiente la selezione genomica in pomodoro, sia dal punto di vista economico in quanto riduce i costi della selezione all'interno di grandi

popolazioni sia per gli effetti benefici sull'ambiente in quanto permette di identificare piante adattate alla gestione a basso impatto e biologica.

Capitolo nono

Conclusioni

Una conclusione importante di questo studio è il grande potenziale fornito dall'integrazione del Breeding partecipativo e con la selezione assistita da marcatori per la coltivazione del pomodoro in biologico. L'approccio seguito si è rivelato una valida alternativa economica alla selezione convenzionale in campo all'interno di popolazioni molto grandi e altamente variabili. Inoltre, lo scambio di conoscenze tra ricercatori e agricoltori nell'ambito della coltivazione e delle esigenze del mercato rappresenta una componente importante per il raggiungimento di vari obiettivi agro-ecologici e socio-economici.

BIBLIOGRAFIA

1. Aflitos, S., Schijlen, E., De Jong, H., De Ridder, D., Smit, S., et al. (2014). Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *Plant J.* 80, 136–148. doi: 10.1111/tpj.12616
2. Annicchiarico, P., F. Bellah, and T. Chiari. 2005. Defining Subregions and Estimating Benefits for a Specific-Adaptation Strategy by Breeding Programs This work was part of the project “Amélioration et renforcement du système nationale d'adaptation du blé dur en Algerie” funded by the Governments of Algeria and Italy.. *Crop Sci.* 45:1741-1749. doi:10.2135/cropsci2004.0524
3. Ashby, J. A. and Lilja, N. (2004) Participatory Research: Does it Work? Evidence from Participatory Plant Breeding. In *New Directions for a Diverse Planet. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. Brisbane, Australia, 26 September–1 October 2004.* Available at 556 <http://www.cropscience.org.au>
4. Ashby, J., 2009. The impact of participatory plant breeding. In: Ceccarelli, S., Guimarães, E.P., Weltzien, E. (Eds.), *Plant Breeding and Farmer Participation.* FAO, Rome, pp. 649–671.
5. Babak, Olga & Nekrashevich, Natalia & Yatsevich, Kanstantsyia & Malyshev, Sergey & Kilchevsky, Alexander. (2018). Genetic bases of tomato

marker-assisted selection in Belarus. *The EuroBiotech Journal*. 2. 10.2478/ebtj-2018-0017.

6. Bai, Yuling & Lindhout, Pim. (2007). Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?. *Annals of botany*. 100. 1085-94. 10.1093/aob/mcm150.

7. Bandillo, Nonoy & Raghavan, Chitra & Muyco, Pauline & Sevilla, Ma & Lobina, Irish & Ermita, Christine Jade & Tung, Chih-Wei & Mccouch, Susan & Thomson, Michael & Mauleon, Ramil & Singh, Rakesh & Gregorio, Glenn & Redoña, Edilberto & Leung, Hei. (2013). Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: Progress and potential for genetics research and breeding. *Rice*. 6. 10.1186/1939-8433-6-11.

8. Bandillo, Nonoy & Raghavan, Chitra & Muyco, Pauline & Sevilla, Ma & Lobina, Irish & Ermita, Christine Jade & Tung, Chih-Wei & Mccouch, Susan & Thomson, Michael & Mauleon, Ramil & Singh, Rakesh & Gregorio, Glenn & Redoña, Edilberto & Leung, Hei. (2013). Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: Progress and potential for genetics research and breeding. *Rice*. 6. 10.1186/1939-8433-6-11.

9. Bauchet G., Causse M. 2012. Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives. In: Caliskan, M. (Ed.), *Genetic Diversity in Plants*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 133–162.

10. Bauchet G., Grenier S., Samson N, Bonnet J, Grivet L, Causse M. 2017. Use of modern tomato breeding germplasm for deciphering the genetic control of agronomical traits by Genome Wide Association study. *Theor Appl Genet*, 130:875–889.
11. Bauchet, Guillaume & Grenier, Stéphane & Samson, Nicolas & Segura, Vincent & Kende, Aniko & Beekwilder, Jules & Cankar, Katarina & Gallois, Jean-Luc & Gricourt, Justine & Bonnet, Julien & Baxter, Charles & Grivet, Laurent & Causse, Mathilde. (2017). Identification of major loci and genomic regions controlling acid and volatile content in tomato fruit: Implications for flavor improvement. *New Phytologist*. 215. 10.1111/nph.14615.
12. Blanca J, Cañizares J, Cordero L, Pascual L, Diez MJ, Nuez F (2012) Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE* 7(10): e48198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048198>
13. BOHN, G.W. & TUCKER C.M. Studies on Fusarium wilt of the tomato. I. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill. and its inheritance in hybrids. *Missouri Agricultural Experimental Station Research Bulletin* 311. 1940.

14. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.
15. Bräutigam, A & Gowik, Udo. (2010). What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*. 12. 831-41. 10.1111/j.1438-8677.2010.00373.x.
16. Campanelli, G.; Canali, S. 2012 Crop Production and Environmental Effects in Conventional and Organic Vegetable Farming Systems: The case of a long-term experiment in mediterranean conditions (Central Italy). *Journal of Sustainable Agriculture* 36: 6 599-619 [ENG, eng]
17. Campanelli, G.; Sestili, S.; Acciarri, N.; Montemurro, F.; Palma, D.; Leteo, F.; Beretta, M. Multi-Parental Advances Generation Inter-Cross Population, to Develop Organic Tomato Genotypes by Participatory Plant Breeding. *Agronomy* 2019, 9, 119.
18. Campanelli, Gabriele & Acciarri, Nazzareno & B., Campion & S., Delvecchio & Leteo, Fabrizio & F., Fusari & P., Angelini & Ceccarelli, Salvatore. (2015). Participatory Tomato Breeding for Organic Conditions in Italy. *Euphytica*. 204. 10.1007/s10681-015-1362-y.

19. Ceccarelli, S. 2015. Efficiency of Plant Breeding. *Crop Sci.* 55:87-97.
doi:10.2135/cropsci2014.02.0158
20. Ceccarelli, Salvatore. (2009). Evolution, plant breeding and biodiversity. *Journal of Agriculture and Environment for International Development.* 103.
10.12895/jaeid.20091/2.28.
21. Chable V., Dawson J., Bocci R., Goldringer I. (2014) Seeds for Organic Agriculture: Development of Participatory Plant Breeding and Farmers' Networks in France. In: Bellon S., Penvern S. (eds) *Organic Farming, Prototype for Sustainable Agricultures.* Springer, Dordrecht
22. Colin Cavanagh, Matthew Morell, Ian Mackay, Wayne Powell, From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 11, Issue 2, 2008, Pages 215-221, ISSN 1369-5266, <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.01.002>.
23. Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B. et al. *Euphytica* (2005) 142: 169. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>
24. Diacono, M., Fiore, A., Farina, R., Canali, S., Di Bene, C., Testani, E., & Montemurro, F. (2016). Combined agro-ecological strategies for adaptation of organic horticultural systems to climate change in Mediterranean environment. *Italian Journal of Agronomy*, 11(2), 85-91.
<https://doi.org/10.4081/ija.2016.730>

25. Dies, M.J., Nuez, F., 2008. Tomato. In: Prohens, J., Nuez, F. (Eds.), *Vegetables II. Hand- book of Plant Breeding*. Springer, New York, pp. 249–326.
26. Doganlar, S., Dodson, J., Gabor, B. et al. *Theor Appl Genet* (1998) 97: 784. <https://doi.org/10.1007/s001220050956>
27. Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
28. Dubey, Manisha & Dhaliwal, Major & Jindal, Suresh & Sharma, Abhishek. (2018). Marker assisted screening of F 2 population for late blight (*Phytophthora infestans*) resistance in indeterminate tomato (*Solanum lycopersicum*) under protected condition. *Indian Journal of Agricultural Sciences*. 88.
29. Effects of straw mulch on growth and yield of durum wheat during transition to Conservation Agriculture in Mediterranean environment, *Field Crops Research*, Volume 167, 2014, Pages 51-63, ISSN 0378-4290, <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.07.008>.
(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378429014002093>)
30. Elshire, RJ & Glaubitz, JC & Sun, Q & Poland, JA. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*. 6.

31. Fabio Stagnari, Angelica Galieni, Stefano Speca, Giovanni Cafiero, Michele Pisante, Management of crop residues to improve quality traits of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits <https://doi.org/10.4081/ija.2017.759>
32. Fazio, G., Stevens, M.R. & Scott, J.W. *Euphytica* (1999) 105: 205. <https://doi.org/10.1023/A:1003497719705>
33. Foolad, Majid. (2007). Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International journal of plant genomics*. 2007. 64358. [10.1155/2007/64358](https://doi.org/10.1155/2007/64358).
34. Gao, Lei & Gonda, Itay & Sun, Honghe & Ma, Qiyue & Bao, Kan & Tieman, Denise & Burzynski-Chang, Elizabeth & Fish, Tara & Stromberg, Kaitlin & Sacks, Gavin & Thannhauser, Theodore & Foolad, Majid & Diez, Maria & Blanca, Jose & Cañizares, Joaquin & Xu, Yimin & Knaap, Esther & Huang, Sanwen & Klee, Harry & Fei, Zhangjun. (2019). The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor. *Nature Genetics*. 51. [10.1038/s41588-019-0410-2](https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2).
35. Garcia, B. E., Graham, E., Jensen, K. S., Hanson, P., Mejía, L. and Maxwell, D. P. 2007. Co-dominant SCAR marker for detection of the begomovirus-resistance Ty-2 locus derived from *Solanum habrochaites* in tomato germplasm. *Rep. Tomato Genet. Coop.*, 57: 21–24

36. Gascuel Q, Diretto G, Monforte AJ, Fortes AM and Granell A (2017). Use of Natural Diversity and Biotechnology to Increase the Quality and Nutritional Content of Tomato and Grape. *Front. Plant Sci.* 8:652.doi: 10.3389/fpls.2017.00652.
37. Gascuel Q., Diretto G., Monforte AJ, Fortes AM, Granell A. (2017). Uso della diversità naturale e della biotecnologia per aumentare la qualità e il contenuto nutrizionale di pomodoro e uva. *Davanti. Plant Sci.* 8 : 652 . 10.3389 / fpls.2017.00652
38. Gaur, Pooran & Jukanti, Aravind & Samineni, Srinivasan & Laxmipathi Gowda, Cholenahalli. (2012). Chickpea (*Cicer arietinum* L.).
39. Gould WA (1983) *Tomato production, processing and quality*, AVI Publ, Westport, CT, USA
40. Grandillo, S., Mustilli, A.C., Parisi, M., Morelli, G., Giordano, I., Bowler, C., 2004. Tec- niche avanzate per la valutazione qualitativa del pomodoro: il caso Campania. *Agroindustria* 3 (2), 151–159.
41. Grandillo, Silvana & Chetelat, Roger & Knapp, Sandra & Spooner, David & Peralta, I.E. & Cammareri, Maria & Perez, Olga & Termolino, Pasquale & Tripodi, Pasquale & Chiusano, M. & Ercolano, Maria & Frusciante, Luigi & Monti, Luigi & Pignone, Domenico. (2011). *Solanum* sect.

Lycopersicon. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources. 129-215. 10.1007/978-3-642-20450-0_9.

42. Heffner, Elliot & Lorenz, Aaron & Jannink, Jean-Luc & Sorrells, Mark. (2010). Plant Breeding with Genomic Selection: Gain per Unit Time and Cost. Crop Science - CROP SCI. 50. 10.2135/cropsci2009.11.0662.

43. Huang, X., Zhao, Y., Wei, X., Li, C., Wang, A., Zhao, Q., et al. (2012b). Genome-wide association study of flowering time and grain yield traits in a worldwide collection of rice germplasm. Nat. Genet. 44, 32–39. doi: 10.1038/ng.1018

44. Huynh, B. , Ehlers, J. D., Huang, B. E., Muñoz-Amatriaín, M. , Lonardi, S. , Santos, J. R., Ndeve, A. , Batiemo, B. J., Boukar, O. , Cisse, N. , Drabo, I. , Fatokun, C. , Kusi, F. , Agyare, R. Y., Guo, Y. , Herniter, I. , Lo, S. , Wanamaker, S. I., Xu, S. , Close, T. J. and Roberts, P. A. (2018), A multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) population for genetic analysis and improvement of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Plant J, 93: 1129-1142. doi:10.1111/tbj.13827

45. Jarvis, P., Lister, C., Szabo, V. et al. Plant Mol Biol (1994) 24: 685. <https://doi.org/10.1007/BF00023565>

46. Ji, Yuanfu & Schuster, David & Scott, John. (2007). Ty3 , a begomovirus resistance locus near the Tomato yellow leaf curl virus resistance locus Ty1 on

chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding - MOL BREEDING*. 20. 271-284. [10.1007/s11032-007-9089-7](https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7).

47. Jordan, S.A., Humphries, P., and McGuire, R.E. Linkage and clinical characterization of families with the RP10 (chromosome 7q) form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. United States: N. p., 1994. Web.

48. Kluwer Academic, Londres

49. Konieczny, A. and Ausubel, F. M. (1993), A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal*, 4: 403-410. [doi:10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.04020403.x)

50. Kover, Paula & Valdar, William & Trakalo, Joseph & Scarcelli, Nora & Ehrenreich, Ian & Purugganan, Michael & Durrant, Caroline & Mott, Richard. (2009). A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to Fine-Map Quantitative Traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics*. 5. e1000551. [10.1371/journal.pgen.1000551](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000551).

51. Ladizinsky G (1998) *Plant Evolution under Domestication*.

52. Ladizinsky G (1998) *Plant Evolution under Domestication*. Kluwer Academic, Londres

53. Lanfermeijer, Frank C. ; Jiang, Guoyong ; Ferwerda, Margriet A. ; Dijkhuis, Jos ; Yang, Rencui ; Hille, Jacques ; de Haan, P. / *The durable*

resistance gene Tm-22 from tomato confers resistance against ToMV in tobacco and preserves its viral specificity. In: *Plant Science*. 2004 ; Vol. 167, No. 4. pp. 687 - 692.

54. Mackay I., Bansept-Basler P., Barber T., Bentley A. R., Cockram J., et al., 2014 An eight-parent multiparent advanced generation intercross population for winter-sown wheat: creation, properties and validation. *G3 (Bethesda)* 4: 1603–1610

55. Maeda, Masahiro & Uryu, Noboru & Murayama, Noriko & Ishii, Hiroko & Ota, Masao & Tsuji, Kimiyoshi & Inoko, Hidetoshi. (1990). A simple and rapid method of HLA-DP genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific endonucleases. *Human Immunology*. 27. 111-121. 10.1016/0198-8859(90)90108-2.

56. Marri, Pradeep & Neelamraju, Sarla & Siddiq, E.A.. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*. 128. 9-17. 10.1023/A:1020691618797.

57. Matsumoto, A. & Tsumura, Y. *Theor Appl Genet* (2004) 110: 80. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1754-1>

58. Mazzucato, A., Papa, R., Bitocchi, E., Mosconi, P., Nanni, L., Negri, V., Picarella, M.E., Siligato, F., Soressi, G.P., Tiranti, B., Veronesi, F., 2008. Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of

Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor. Appl. Genet.* 116 (5), 657–669, <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-007-0699-6>.

59. McDermott JM, Brandle U, Dutly F, Heammerli UA, Keller S, Muller KE, Wolfe MS (1994) Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR, and VNTR markers. *Phytopathology* 84:1316–1321

60. McMullen, Michael & Kresovich, Stephen & Villeda, Hector & Bradbury, Peter & Li, Huihui & Sun, Qi & Flint-Garcia, Sherry & Thornsberry, Jeffry & Acharya, Charlotte & Bottoms, Christopher & Brown, Patrick & Browne, Chris & Eller, Magen & Guill, Kate & Harjes, Carlos & Kroon, Dallas & Lepak, Nick & Mitchell, Sharon & Peterson, Brooke & Buckler, Edward. (2009). Genetic Properties of the Maize Nested Association Mapping Population. *Science* (New York, N.Y.). 325. 737-40. [10.1126/science.1174320](https://doi.org/10.1126/science.1174320).

61. Meuwissen, T.H.E., B.J. Hayes, and M.E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157(4): 1819–1829. doi: 11290733

62. Michaels, S. D. and Amasino, R. M. (1998), A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *The Plant Journal*, 14: 381-385. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00123.x

63. Miller, J.C. & Tanksley, S.D. *Theoret. Appl. Genetics* (1990) 80: 437.
<https://doi.org/10.1007/BF00226743>
64. Miller, JC & Tanksley, SD *Theoret. Appl. Genetica* (1990) 80: 437.
<https://doi.org/10.1007/BF00226743>
65. Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A. et al. *Molecular Breeding* (1997) 3:
87. <https://doi.org/10.1023/A:1009651919792>
66. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki RK, Horn G, Erlich H (1986)
Specific enzymatic amplication of DNA in vitro: the polymerase chain
reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 51: 263–
273.
67. Nakamura Y, Leppert M, O’Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M et
al. (1987) Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene
mapping. *Science* 235: 1616–1622
68. Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. and Pepper, A. E. (1998), dCAPS, a
simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms:
experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *The Plant Journal*,
14: 387-392. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00124.x
69. Nicolas Ranc, Stephane Muños, Jiaxin Xu, Marie-Christine Le Paslier,
Aurélié Chauveau, Rémi Bounon, Sophie Rolland, Jean-Paul Bouchet,
Dominique Brunel and Mathilde Causse Genome-Wide Association Mapping

in Tomato (*Solanum lycopersicum*) Is Possible Using Genome Admixture of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* G3: GENES, GENOMES, GENETICS August 1, 2012 vol. 2 no. 8 853-864;

70. Oakey, H., Verbyla, A., Pitchford, W. et al. *Theor Appl Genet* (2006) 113: 809. <https://doi.org/10.1007/s00122-006-0333-z>

71. Paran, I. & Michelmore, RW *Theoret. Appl. Genetica* (1993) 85: 985. <https://doi.org/10.1007/BF00215038>

72. Pascual, L., Desplat, N., Huang, B. E., Desgroux, A., Bruguier, L., Bouchet, J.-P., Le, Q. H., Chauchard, B., Verschave, P. and Causse, M. (2015). Potential.

73. Pascual, Laura & Desplat, Nelly & Huang, Bevan & Desgroux, Aurore & Bruguier, Laure & Bouchet, Jean-Paul & Le, Quang & Chauchard, Betty & Verschave, Philippe & Causse, Mathilde. (2015). Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant Biotechnology Journal*. 13. 10.1111/pbi.12282.

74. Peralta, I.E. & Spooner, D.M.. (2005). Morphological characterization and relationships of wild tomatoes (*Solanum* L. Section *Lycopersicon*). *Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard*. 104. 227-257.

75. Quinet M., Kinet J.M. and Lutts S. (2010) Flowering response of the uniflora:blind:self-pruning and jointless:uniflora:self-pruning tomato (*Solanum lycopersicum*) triple mutants. *Physiol. Plant.* 141, 166–176.
76. Raupp, Joachim; Pekrun, Carola; Oltmanns, Meike and Köpke, Ulrich (Eds.) (2006) Long Term Field Experiments in Organic Farming. ISO FAR Scientific Series, no. 1. Verlag Dr. Köster, Berlin.
77. Robertson, Larry & Labate, Joanne. (2006). Genetic Resources of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Wild Relatives. 10.1201/b10744-3.
78. Ronen, G., Carmel-Goren, L., Zamir, D., and Hirschberg, J. (2000). An alternative pathway to b-carotene formation in plant chromoplasts discovered by map-based cloning of Beta and old-gold color mutations in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11102–11107
79. Rongwen, J., Akkaya, MS, Bhagwat, AA et al. *Theoret. Appl. Genetica* (1995) 90: 43. <https://doi.org/10.1007/BF00220994>
80. Sannemann, Wiebke & Huang, Bevan & Mathew, Bobby & Léon, Jens. (2015). Multi-parent advanced generation inter-cross in barley: high-resolution quantitative trait locus mapping for flowering time as a proof of concept. *Molecular Breeding*. 35.

81. Shi, Ainong & Vierling, Richard & Grazzini, Richard & Chen, P. & Caton, Homer & Panthee, Dilip. (2011). Identification of molecular markers for Sw-5 gene of tomato spotted wilt virus resistance. *American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences*. 1. 2159-3698. 10.5251/ajbms.2011.1.1.8.16.
82. Soressi, G.P., 1969. *Il Pomodoro*. Edagricole, Bologna. Tournefort JPD (1694) *Elemens de Botanique*. l'Imprimerie royale, Paris, France
83. Steven Henikoff, Bradley J. Till, Luca Comai TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics *Plant Physiology* Jun 2004, 135 (2) 630-636; DOI: 10.1104/pp.104.041061
84. Stevens, M.A. & Rick, C.M.. (1986). *Tomato Genetics and Breeding*. In: Atherton, J.G. and J. Rudich, (Eds.). 35-100.
85. The Tomato Genome Consortium (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485, 635–641. doi: 10.1038/nature11119The 100 Tomato Genome Sequencing Consortium,
86. Thomas, C. M., Vos, P. , Zabeau, M. , Jones, D. A., Norcott, K. A., Chadwick, B. P. and Jones, J. D. (1995), Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 8: 785-794. doi:10.1046/j.1365-313X.1995.08050785.x

87. Varshney, R.K., Thudi, M., Nayak, S.N. et al. *Theor Appl Genet* (2014) 127: 445. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2230-6>
88. Weber D, Helentjaris T (1989) Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations. *Genetics* 121:583–590
89. Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl Acids Res* 18:7213-7218
90. Welsh, John & McClelland, Michael. (1991). Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218. *Nucleic acids research*. 18. 7213-8. [10.1093/nar/18.24.7213](https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213).
91. Witcombe JR, Yadavendra JP. 2014. How much evidence is needed before client-oriented breeding (COB) is institutionalised? Evidence from rice and maize in India. *Field Crops Res* 167: 143–152.
92. Xu J, Ranc N, Munos S, Rolland S, Bouchet J, Desplat N, LePaslier M, Liang Y, Brunel D, Causse M (2013) Phenotypic diversity and association mapping for fruit quality traits in cultivated tomato and related species. *Theor Appl Genet* 126:567–581
93. Yang, W. C. and Francis, D. M. 2005. Marker-assisted selection for combining resistance to bacterial spot and bacterial speck in tomato. *J Am. Soc. Hort. Sci.*, 130: 716–721.

94. Yang, X., Caro, M., Hutton, S.F. et al. *Mol Breeding* (2014) 34: 749.
<https://doi.org/10.1007/s11032-014-0072-9>
95. Zamir, Dani. (2002). Zamir, D. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat. Rev. Genet.* 2, 983-989. *Nature reviews. Genetics.* 2. 983-9. 10.1038/35103589.