

**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**



Corso di Laurea Magistrale
in
Biologia Molecolare e Applicata

**Cisgenesi e Gene Editing in pomodoro: studi preliminari
per l'aumento del contenuto in solidi solubili**

*“Cisgenesis and Gene Editing in tomato: preliminary studies for
increasing the soluble solids content”*

Laureanda

Federica Acciarini

Relatore

Anna La Teana

Co-Relatore

Dott. Sara Sestili

Dott. Daniela Palma

Sessione Estiva - Luglio 2021

Anno Accademico 2020/2021

“Chi non si aspetta l’inaspettato non troverà mai la verità”
Eraclito

SOMMARIO

RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT	8
1. Introduzione.....	11
1.1 Il pomodoro	11
1.1.1 Origine e diffusione del pomodoro	11
1.1.2 Caratteristiche botaniche e fisiologiche	23
1.1.3 Risorse genetiche	32
1.1.4 Caratteristiche qualitative: solidi solubili o grado Brix	41
1.2 Miglioramento genetico del pomodoro	46
1.2.1 Obiettivi del miglioramento genetico	50
1.2.2 Miglioramento genetico convenzionale: le linee di introgressione per il grado Brix	55
1.2.3 Miglioramento genetico biotecnologico	72
1.3 Nuove tecniche di miglioramento genetico in pomodoro.....	91
1.3.1 Cisgenesi	94
1.3.2 Genome editing	98
2. Scopo della tesi	112

3. Materiali e Metodi	114
3.1 Materiale vegetale	114
3.2 Prove di rigenerazione.....	116
3.3 Trasformazione di <i>Escherichia coli</i> e <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	119
<i>Cisgenesi</i>	123
3.4 Schema sperimentale.....	123
3.5 Preparazione dei costrutti	128
<i>Gene editing</i>	134
3.6 Schema sperimentale.....	134
3.7 Preparazione dei costrutti	137
3.8 Esperimenti di trasformazione via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	147
4. Risultati	149
4.1 Prove di rigenerazione	149
4.2 Cisgenesi	155
4.3 Gene editing	161
5. Discussione	176
6. Conclusioni	188
7. Bibliografia	190
8. Sitografia	214

RIASSUNTO

Il pomodoro coltivato (*Solanum lycopersicum* L.) è una delle specie ortive più diffuse a livello mondiale. I suoi frutti vengono consumati sia allo stato fresco sia trasformato, si pensi solo a quante tonnellate di passata di pomodoro vengono prodotte solo nel nostro paese.

La produzione di frutti di elevata qualità organolettica e nutrizionale rappresenta uno dei principali obiettivi del miglioramento genetico del pomodoro. Uno dei più importanti parametri della qualità del frutto di pomodoro è il contenuto di **solidi solubili totali** (TSS) o **grado Brix**.

I TSS sono una classe di composti presente nei frutti in percentuali differenti ed è rappresentata da acidi organici, lipidi, minerali, pigmenti, sostanze volatili e zuccheri riducenti quali glucosio, fruttosio e saccarosio, sebbene quest'ultimo presente in piccole quantità. Gli zuccheri rappresentano i componenti principali dei solidi solubili, mentre le altre sostanze sono presenti in quantità minori.

L'ISS include negli SS anche proteine, cellulosa, emicellulosa, pectine e polisaccaridi, che si trovano nella polpa.

La quantità di TSS nel pomodoro coltivato è compresa tra il 4,5 e l'8,5% del suo peso fresco, percentuale che può variare da un genotipo all'altro. Tuttavia, questo valore risulta nettamente più alto nelle specie selvatiche di pomodoro,

tra cui *Solanum pennellii*, nelle quali si misurano concentrazioni di SS che vanno dal 9 al 15% del peso fresco.

Un grado Brix elevato è indice di una maggiore dolcezza e consistenza del frutto come anche di un aumentato contenuto in sostanze aromatiche, vitamine e della shelf-life del prodotto.

Bacche con alti livelli di acido citrico ed acido malico e, quindi, con pH molto basso, risultano eccessivamente acidi oltre che possedere bassi livelli di solidi solubili e pertanto sono poco graditi al consumatore, sebbene l'elevata acidità sia ricercata nei pomodori destinati alla trasformazione.

Il progetto ministeriale “*Biotecnologie sostenibili per l'agricoltura Italiana*” (BIOTECH), sottoprogetto “*Cisgenesi e genome editing in pomodoro*” (CISGET) è finalizzato ad accelerare i programmi di miglioramento genetico in pomodoro sui temi della resistenza agli stress biotici ed abiotici e del miglioramento della qualità organolettica, nutrizionale e tecnologica dei frutti come anche della sostenibilità ambientale della coltivazione.

Nell'ambito di questo progetto, il **Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria** (CREA) è coinvolto con i suoi Centri di ricerca in attività relative a tutte le tematiche del progetto. L'attività di ricerca del CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF), sede di

Monsampolo del Tronto (AP) è finalizzata alla produzione ed analisi di mutanti per il contenuto in solidi solubili (grado Brix).

In *Solanum pennellii* è stata individuata nel gene LIN5 codificante l'invertasi apoplastica che catalizza la reazione di idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio, la mutazione a singolo nucleotide (SNP) che conferisce una maggiore affinità dell'enzima per il saccarosio e di conseguenza un maggiore grado Brix nei frutti.

L'attività di ricerca ha previsto l'impiego delle “**Tecnologie per l'Evoluzione Assistita**” (TEA), termine con cui la Società Italiana di Genetica Agraria ha recentemente definito le “New Breeding Techniques” (NBT), quali il **Genome Editing** e la **Cisgenesi**, per introdurre la mutazione a singolo nucleotide SNP presente nel gene Lin5 del pomodoro selvatico *Solanum pennellii* in diversi genotipi di *Solanum lycopersicum* destinati al consumo fresco e all'industria.

ABSTRACT

Farmed tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most widespread vegetable species in the world. Its fruits are consumed both fresh and transformed, one need only think of how many tons of tomato puree are produced in our country. The production of high organoleptic and nutritional quality fruits represents one of the main tomato genetic improvement's purpose.

The total soluble solids (TSS) content or degree Brix represents one of the most important quality parameters of tomato fruit. TSS are a class of fruits compounds that consist in organic acids, lipids, minerals, pigments, volatile substances and reducing sugars such as glucose, fructose and sucrose, although the latter present in small quantities. Sugars are the main components of soluble solids, while other substances are present in smaller quantities.

The ISS includes also proteins, cellulose, hemicellulose, pectins and polysaccharides in SS as they have been found in the pulp.

The amount of TSS in farmed tomato ranging from 4.5 to 8.5% of its fresh weight, and this percentage can vary between different genotypes. However, this value is significantly higher in wild tomato species, including *Solanum*

pennellii, in which concentrations of SS ranging from 9 to 15% of the fresh weight.

A higher Brix degree means an increase in the product's potential sweetness and compactness, but also of sought-after qualities, such as the pH of the pulp around 4.5-5, a higher content of aromatic substances and vitamins and a longer shelf-life of the product.

Berries with high levels of citric and malic acid show a very low pH as also lower content of soluble solids, resulting excessively acidic and therefore unpleasant to the consumer, although this high acidity is desirable in tomatoes intended for processing.

The National project "***Sustainable biotechnologies for Italian agriculture***" (BIOTECH), sub-project "***Cisgenesis and genome editing in tomato***" (CISGET) is aimed at accelerating the genetic improvement programs in tomatoes on the issues of environmental sustainability of cultivation, resistance to biotic and abiotic stress and the improvement of the organoleptic, nutritional and technological quality of the fruits.

As part of this project, the Council for Agricultural Research and Analysis of the Agricultural Economy (CREA) is involved with its Research Centers in activities relating to all the themes of the project. The research activity of the CREA Research Center for Horticulture and Horticulture (CREA-OF), located

in Monsampolo del Tronto (AP), has the purpose of mutants producing and analysing for the content in soluble solids (Brix degree).

A single nucleotide mutation (SNP) found in LIN5 gene of *Solanum pennellii*, a gene that encodes an apoplastic invertase that catalyzes the sucrose hydrolysis reaction into glucose and fructose, has been seen to be able to confer a greater enzyme affinity for sucrose and consequently to cause the Brix degree in fruits to increase.

The use of the ***New Breeding Techniques*** (NBT) such as Genome Editing and Cisgenesis, currently defined as ***Assisted Evolution Techniques*** (TEA), were involved in the research activity in order to introduce the LIN5 gene single nucleotide SNP mutation of the wild tomato *Solanum pennellii* in different genotypes of *Solanum lycopersicum* intended for both fresh consumption and industry production.

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Pomodoro

1.1.1 Origine e diffusione del pomodoro

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una pianta erbacea annuale appartenente alla famiglia delle Solanaceae, un'ampia famiglia di Angiosperme, diffuse in tutto il mondo, che comprende più di 3000 specie, molte da trattare con prudenza.

Infatti, mentre alcune di esse sono colture alimentari che provvedono al fabbisogno di milioni di persone, come la patata, il pomodoro, la melanzana e il peperone, molte altre sono piante medicinali e vengono usate sin dall'antichità come medicine portentose a causa del loro alto contenuto di alcaloidi, che sono sostanze organiche con effetti particolari sul sistema nervoso umano.

Tra queste si annoverano la belladonna, lo stramonio, la dulcamara e la mandragora che possono essere considerate, a seconda della dose, dei veleni, ma anche droghe più o meno consentite come il tabacco.

È proprio per queste caratteristiche della famiglia di appartenenza che il pomodoro prende il nome latino di *Solanum lycopersicum* che deriva da “*Sólor*”, cioè alleviare, lenire, che si riferisce alle proprietà medicamentose precedentemente riportate di molte specie, e “*lycopersicum*” che deriva dal

greco *λύκος* *lycos* cioè *lupo* e da (*málus*) *pérsica* cioè *pesco* che significa “*pesco del lupo* (Portale della Flora d’Italia) poiché per secoli il pomodoro è stato ritenuto dagli europei velenoso e non veniva consumato come ortaggio ma solo considerato come pianta ornamentale.

La scoperta della sua commestibilità dopo quasi due secoli causa una controversa classificazione botanica di questa specie. Nel 1753 Carl Vonn Linnè nel suo trattato “Species Plantarum”, classificò il pomodoro come *Solanum lycopersicum* L. mentre nel 1768 Philip Miller descrisse il genere *Lycopersicon* e definì la specie di pomodoro coltivato *Lycopersicon esculentum*, cioè “*squisito*”.

Il centro di origine del pomodoro è l’America Latina, in particolare la regione montagnosa delle Ande compresa tra Perù, Ecuador e Bolivia.

La domesticazione del pomodoro è avvenuta in tempi relativamente recenti, circa 7 milioni di anni fa, sebbene il sequenziamento del genoma del pomodoro coltivato e del suo antenato selvatico, *Solanum pimpinellifolium*, abbia dimostrato che il genoma di pomodoro sia “triplicato” improvvisamente circa 60 milioni di anni fa, in un momento vicino alla grande estinzione di massa e, successivamente, la maggior parte della variabilità genica sia stata persa a seguito del nefasto evento, lasciando un contenuto pool genico che controlla

ancora oggi caratteristiche importanti della pianta (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Nonostante l'origine geografica delle specie selvatiche affini sia ben conosciuta, il luogo in cui far risalire la domesticazione del pomodoro rimane incerto. Esiste una teoria che indica il Messico meridionale e un'altra il Perù (Fig.2).

La prima si basa sulla diffusione in Messico di forme selvatiche di pomodoro a bacca tondo-piccola, verde e poco più grande di un acino d'uva, definite "cherry", incluse nella forma botanica *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, ed è avvalorata da evidenze culturali, linguistiche, storiche e genetico-molecolari.

Questo capostipite dei pomodori era tossico, come molte specie appartenenti alla famiglia delle solanacee, in quanto contenente la solanina, un alcaloide che la pianta produce per difendersi da funghi e insetti ma che, se ingerita, provoca nausea, diarrea, vomito, fino alle allucinazioni e alla paralisi.

Il merito della diffusione del pomodoro come pianta coltivata e, quindi, della sua domesticazione, va agli Aztechi, che incontrarono la pianta come infestante nei campi di mais, ma che presto scoprirono che ne migliorava la produzione.

Gli aztechi, come anche altre civiltà del centro e sud America, erano un popolo di abili agricoltori che aveva affinato un sistema produttivo in grado di competere per alcuni aspetti con la moderna agricoltura, basato sulla



Figura 1. Isole artificiali, con orti e giardini, sui fiumi di Antonio de Herrera (Dondarini R., Dondini M., 2010)

regimentazione delle acque e sulla sistemazione del terreno (Fig.1). Essi furono in grado di selezionare le piante meno tossiche e pazientemente, nel giro di alcuni secoli, riuscirono a trasformarlo nel *tomatl*.

L'azione di domesticazione operata da questo popolo ha portato ad un cambiamento del patrimonio genico del pomodoro, mediante vari incroci tra specie contenenti quantità di solanina sempre minori, e ciò ha portato alla nascita di piante che producevano frutti commestibili.

La domesticazione peruviana è, invece, supportata da argomentazioni di tipo botanico, storico e linguistico principalmente evidenziate dall'opera del botanico svizzero De Candolle (1886).

Sebbene l'origine geografica del pomodoro coltivato sia tuttora irrisolta, è maggiormente condivisa la sua origine botanica dalle forme spontanee di *S. lycopersicum* var. cerasiforme, a cui hanno contribuito introgressioni, cioè l'incorporazione di geni e quindi di caratteri derivanti dalla specie selvatica, in

virtù di indizi morfologici e fisiologici, da *S. pimpinellifolium* nonché di tipo genetico e genetico-molecolare.

Non si sa con precisione quando e come i pomodori giunsero in Spagna: forse con Colombo, certamente con le navi dei Conquistadores capitanate da Cortés.



Figura 2. La presunta origine del pomodoro, tuttora irrisolta, sembra essere il Perú. Quasi certamente, poi, dal Messico fu portato in Spagna e da lì si diffuse in tutta Europa. (Soressi G., Mazzucato A., 2010)

Furono proprio i soldati di Cortés, infatti, che ne appresero dagli Indios le virtù e il frutto maturo rappresentò una fonte di nutrimento e acqua nella calda regione che stavano percorrendo. Esistono pochissime fonti storiche, una è la testimonianza scritta del soldato Bernal Diaz del Castillo, che prese parte alla spedizione di Hernán Cortés del 1517, e l'altra del Padre José de Acosta, riportata nel libro *Historia natural y moral de las Indias*, pubblicato a Siviglia nel 1590, che riportano quanto fosse diffuso il consumo del pomodoro tra gli

Aztechi. Il frutto di questa pianta, inoltre, veniva consumato sia da solo che in salse, preparate quotidianamente e vendute anche pronte.

Agli albori del XVI secolo il pomodoro fu diffuso dagli Spagnoli in tutta Europa, assumendo denominazioni diverse (Grandillo et al., 2004). Centro di diffusione fu certamente la città di Siviglia, crocevia importantissimo di scambi culturali e commerciali, e proprio di qui partirà la lunga *marcia del pomodoro*. È probabile che la sua introduzione in Europa sia avvenuta a partire sia da specie domestiche sia selvatiche, ed era utilizzata come curiosità botanica o ornamentale, non consigliabile per il consumo alimentare in quanto considerata insalubre (Soressi, 1969; Paradossi, et al. 2018).

Nel secolo che seguì, l'utilizzo del pomodoro in cucina continuò lentamente a diffondersi, divenendo di uso comune tra le persone meno abbienti che si rivolgevano alle mense per poter mangiare. Per ragioni geografiche e politiche, dalla Spagna il pomodoro passò velocemente al Vicereame di Napoli, dove trovò una situazione climatica adatta alla sua diffusione, e di lì negli orti botanici di tutta Italia. Qui il famoso medico e naturalista *Pier Andrea Mattioli*, lo chiamò “**pomo d'oro**”, lasciando supporre che la prima varietà fosse di colore giallo e associandolo alla melanzana, mentre il naturalista, Pier Antonio Michiel, prefetto dell'orto botanico di Padova, risultò sospettoso nei confronti del consumo del frutto del quale scriveva: “*Mangiasi di questi frutti tagliati in*

sonde nella paella con butiro over oglio ma son di dano e nocivi. Il suo odore di questa pianta caggionano male alli occhi e alla testa”.

Sembra, dunque, che a questa pianta non si attribuisse alcun reale interesse alimentare, e che anzi la si ritenesse portatrice di molte caratteristiche negative, quando addirittura non pericolose per la salute.

Sebbene queste piante non fossero viste come alimenti, furono accolte con grande favore per la loro bellezza. Nelle regioni del Nord Europa, dove la coltivazione risultava difficoltosa per ragioni climatiche, le piante venivano collocate nei giardini, adornavano spalliere ed erano donate alle donne come pegno d’amore. A questo proposito, non mancano affascinanti racconti e leggende, si narra, infatti, che Sir Walter Raleigh ne avesse donato una piantina carica di frutti alla regina Elisabetta I, chiamandola *apple of love* (Dondarini R., Dondini M., 2010).

In Italia, pur essendo entrato a far parte della cucina italiana relativamente tardi rispetto ad altri alimenti, il pomodoro ha conquistato una posizione di tutto rispetto nella nostra alimentazione essendo l’emblema di piatti tipici e caratteristici. Dapprima, per circa due secoli, questa bacca entrò nell’uso della cucina povera meridionale e, quando per la prima volta comparve in una ricetta, era già stata largamente sperimentata ed era pronta per entrare trionfalmente nella cucina “alta”. Nel 1700 in Europa erano note sette varietà, inclusa una di

grandi dimensioni e di colore rosso e nel 1832 un un famoso cuoco, Vincenzo Agnoletti, pubblica in uno dei suoi libri, la ricetta per la “*Conserva di pomodoro al fresco*”.

La necessità di preparare quella che è attualmente conosciuta come “passata di pomodoro” fu, probabilmente, scaturita dalla guerra e l’Agnoletti segue gli insegnamenti di Nicolas Appert per conservare il preparato per lungo tempo (Fig.3).



Figura 3. Pubblicità degli anni '30 delle prime conserve prodotte in Italia. (Dondarini R., Dondini M., 2010)

Mentre il pomodoro vinceva la sua gara contro la deperibilità, avveniva anche un altro incontro fortunato, sulla cui data e sulle cui modalità si è molto scritto: quello con la pasta (Fig.4), che si verificò ufficialmente quasi tre secoli dopo lo sbarco del pomodoro in Europa (Dondarini R., Dondini M., 2010) e nel 1837 il Cavalcanti riporta la prima ricetta per



Figura 4. Totò e la pasta al pomodoro. (Dondarini M., Dondini M., 2010)

condire i maccheroni col pomodoro, una ricetta che fu giudicata a suo tempo semplice e plebea in quanto ricavata dalla cucina della povera gente di Napoli, che fu la vera inventrice del ragù.

Al giorno d'oggi la situazione è cambiata molto rispetto a quella che si aveva nel XIX secolo, infatti, da anni il paese leader nella produzione di pomodori è la Cina che nel 2019 ha prodotto 62.764.671 tonnellate di questo ortaggio.

Le province dove le colture sono maggiormente sviluppate sono lo Shandong, Xinjiang, Hebei e Henan che, messe insieme, rappresentano oltre la metà della produzione totale di pomodori freschi di questo paese.

Come si evince dalla Tab.1 e dai grafici (Fig.5), ricavati dal database della *FAO (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura)* aggiornato al 2019 (FAO-STAT, 2019), tra i **primi 10 paesi produttori di pomodori** il principale produttore al mondo è la Cina, seguita dall'India e dalla Turchia.

Inoltre, nel 2017 è stata registrata la produzione di 182,301 milioni di tonnellate di pomodori in tutto il mondo, raggiungendo un nuovo record (FAO-STAT, 2017) ed negli ultimi 10 anni si è registrato un aumento della produzione del 35,76% (www.fao.org/faostat).

	Paese	Produzione
1.	CINA	62.764.671 tonnellate
2.	INDIA	19.007.000 tonnellate
3.	TURCHIA	12.841.990 tonnellate
4.	STATI UNITI	10.858.990 tonnellate
5.	EGITTO	6.751.856 tonnellate
6.	ITALIA	6.577.109 tonnellate
7.	IRAN	5.248.904 tonnellate
8.	SPAGNA	5.000.560 tonnellate
9.	MESSICO	4.271.914 tonnellate
10.	BRASILE	3.917.967 tonnellate

Tabella 1. I primi 10 paesi produttori di pomodoro al mondo sulla base della produzione in tonnellate di prodotto (FAO-STAT, 2019) (www.fao.org/faostat).

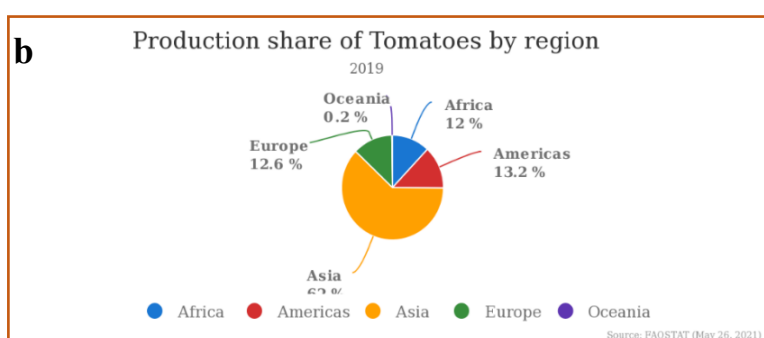
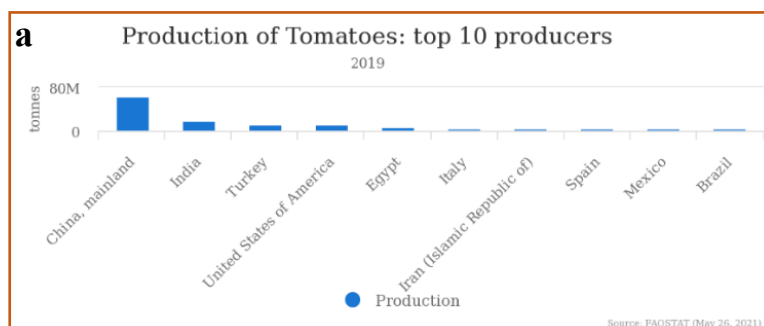


Figura 5. a) Istogramma dei 10 maggiori produttori mondiali di pomodoro nel 2019; b) Diagramma circolare della produzione di pomodoro in percentuale per regione nel 2019 (FAO-STAT, 2019, www.fao.org/faostat).

Il pomodoro è diventato uno degli ortaggi più consumati al mondo ed è secondo solo alla patata (Fig.6) ed è stato stimato che la superficie mondiale complessiva utilizzata per questa coltura è di circa 5 milioni di ettari, raccogliendo in media 3,7 kg di questi ortaggi per metro quadro.

In Italia la sua produzione risulta principalmente localizzata in Emilia-Romagna (province di Parma e Piacenza) ed in Campania (province di Napoli e Salerno) raggiungendo livelli elevati, soprattutto per le varietà destinate all'industria conserviera. L'industria di trasformazione assorbe una quota decisamente rilevante della produzione mondiale di pomodoro, valutabile attorno al 24-27% annuo e, nell'ambito dei paesi del Bacino del Mediterraneo, l'Italia rappresenta il principale produttore con volumi variabili da 4,5 a 6,5 milioni di tonnellate, sebbene sia stato registrato un calo della produzione di anno in anno.

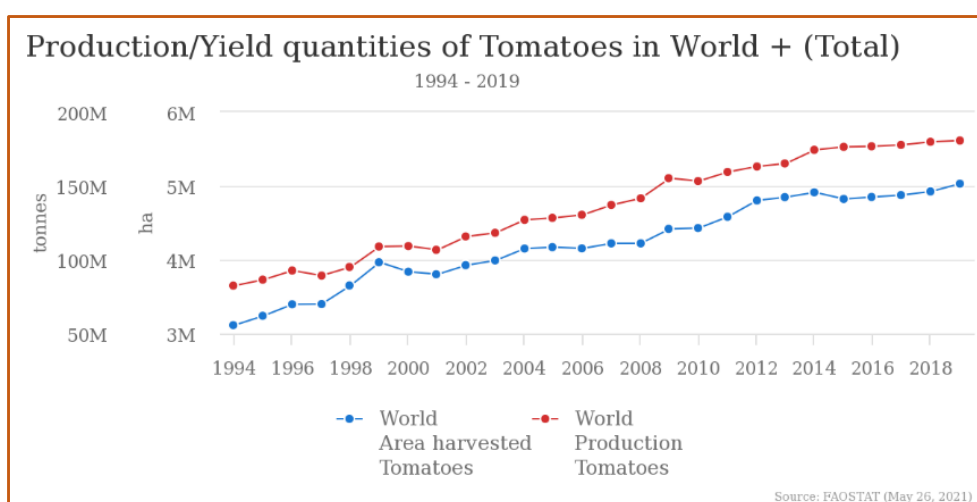


Figura 6. Incremento della produzione mondiale di pomodoro espresso in tonnellate/ha registrato tra il 1994 e il 2019 (www.fao.org/faostat).

Il 2021 sembra, però, essere un anno promettente proprio grazie alla pandemia da Covid-19. Dopo anni di costante calo dei consumi, infatti, l'industria conserviera ha archiviato a dicembre 2020 un incremento delle vendite nella distribuzione organizzata del 9,8% rispetto a dicembre 2019 e la campagna di produzione dell'estate 2020 si è chiusa con un incremento del'8% dei quantitativi conferiti all'industria conserviera nazionale.

Proprio grazie a questo “*effetto Covid*”, nel Nord Italia sono già stati firmati i pre-contratti tra produttori e industria e le primissime stime indicano un aumento delle superfici di produzione di circa 1.300 ettari con un coinvolgimento anche delle coltivazioni biologiche, in costante crescita negli ultimi anni (<https://www.ilsole24ore.com>).

1.1.2 Caratteristiche botaniche e fisiologiche

Classe: Dicotiledoni
Famiglia: Solanaceae
Genere: Solanum
Specie: Solanum lycopersicum



Figura 7. *Poma amoris fructu rubro*, *Eicone plantarum*, Francoforte 1590

Il pomodoro coltivato, così come tutte le specie affini e ancestrali, si presenta in forma diploide, con formula genomica $2n = 2x = 24$.

È una pianta erbacea potenzialmente perenne in relazione alle condizioni pedoclimatiche, ma annuale in coltura e il cui fusto può raggiungere un'altezza che va da 0,7 a 2 metri (<https://www.agraria.org>). Le piante nate e cresciute in

posto sviluppano una forte radice fittonante che ramifica abbondantemente e forma un denso apparato radicale; nel caso di piante trapiantate il fittone perde la sua predominanza; la massima profondità di radicamento varia da 0,7 a 1,5 metri.

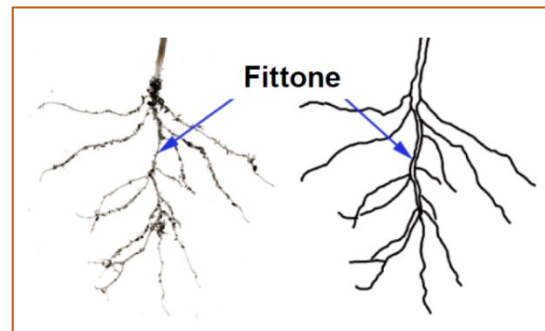


Figura 8. L'apparato radicale è di tipo fittonante, con abbondanti radici secondarie che si dipartono dalla principale; il fittone si approfondisce molto nei suoli leggeri, ma il 70% dell'apparato radicale è situato nei primi 40-50 cm di terreno.

Le foglie hanno grandi dimensioni, sono composte, alterne, picciolate, pennatosette e irregolarmente composte da foglioline diseguali a lembo più o

meno inciso e lo sviluppo della pianta può essere di tipo determinato o indeterminato (Fig.9). Lo **sviluppo indeterminato** presenta un fusto con meristema apicale che mantiene per tutta la vita della pianta la capacità di formare foglie e infiorescenze all'ascella di queste, ciò, però, implica che l'utilizzo di tutori per mantenere eretto il fusto e i germogli laterali che si formano debbono essere eliminati con asportazione manuale, chiamata "scacchiatura" o *sfemminellatura*. Lo **sviluppo determinato**, invece, si ha quando 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. Questi mutanti vengono chiamati "*self-pruning*".



Figura 9. Sviluppo indeterminato (immagine a sinistra) e determinato (immagine a destra) della pianta di pomodoro.

Originariamente la pianta di pomodoro era molto espansa, ramificata e strisciante, ma, a seguito delle selezioni operate dall'uomo, le due tipologie, determinata e indeterminata, sono risultate dominanti.

Le piante a sviluppo indeterminato vengono utilizzate per la produzione di pomodoro da mensa, mentre quelle a sviluppo determinato quasi esclusivamente per la produzione di pomodoro destinato alla trasformazione industriale. Lo stimolo alla fioritura è autonomo, ossia svincolato dal controllo del fotoperiodo.

Dopo un periodo di crescita vegetativa, rappresentato dallo sviluppo di circa 8-12 foglie, o anche meno, in dipendenza di condizioni ambientali particolari come per esempio basse temperature, la pianta emette la prima infiorescenza.

Successivamente viene emessa una nuova infiorescenza ogni tre internodi.

I fiori si formano in numero variabile da 4 a 12 su infiorescenze a racemo che sorgono all'ascella delle foglie e sono gialli, bisessuati, con ovario supero pluriloculare e pluriovulare, con 5 o più stami ed antere che formano un manicotto intorno al pistillo, motivo questo per cui la fecondazione è prevalentemente autogamica (Fig.10).

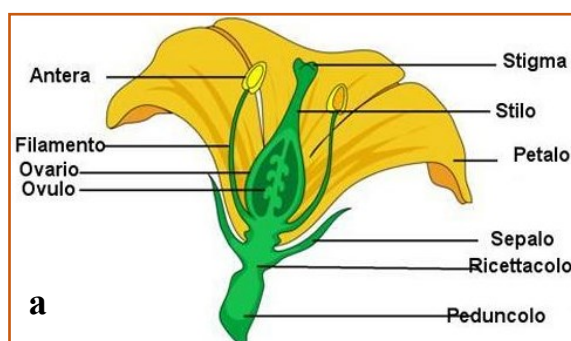


Figura 10. a) Struttura del fiore di pomodoro; b) Immagine del fiore di pomodoro.

Il ciclo biologico delle comuni varietà termina con il disseccamento delle foglie, le basali per prime, per concludersi con il disseccamento del fusto; l'intero ciclo richiede in coltura 140-170 giorni a seconda del tipo di sviluppo e delle condizioni di allevamento.

L'**ambiente di coltivazione** ottimale per il pomodoro è quello delle regioni calde e temperato-calde, poiché il clima e, soprattutto, la temperatura condizionano lo sviluppo della pianta. Quest'ultima ha, infatti, elevate esigenze termiche, è assai sensibile al gelo e trova nel periodo estivo la sua stagione di crescita, altrimenti deve essere coltivata sotto serra. Al pomodoro, inoltre, non si confanno gli ambienti umidi che favoriscono le malattie e i marciumi, si preferisce un clima piuttosto secco, con terreni a grande capacità di ritenzione idrica o con possibilità di irrigazione. Il fotoperiodo può modificare la morfologia generale della pianta; benché la specie si comporti da neutrodiurna, intensità e qualità della luce sembrano influenzare l'epoca di fioritura, il grado di allegagione e la colorazione delle bacche. I *limiti termici* del pomodoro (Tab.2) sono fondamentali per un corretto sviluppo della pianta nonché della sua sopravvivenza.

	Temperatura (°C)	
<i>minimo letale</i>	0-2 °C	<i>Tabella 2. Limiti termici della coltura di pomodoro.</i>
<i>minimo biologico</i>	8-10 °C	
<i>ottimale notturna</i>	13-16 °C	
<i>ottimale diurna</i>	22-26 °C	
<i>massimo biologico</i>	26-30 °C	
<i>minima di germinazione</i>	9-10 °C	
<i>ottimale di germinazione</i>	20-30 °C	

Temperature superiori a 30-35 °C influiscono negativamente sull'allegagione, sulla formazione del licopene e sulla pigmentazione delle bacche (D. Daprà, 2011).

Una *coltura trapiantata* ha un ciclo di 100-120 giorni, durante il quale il fabbisogno idrico totale è di circa 400 mm, secondo il clima, mentre nel caso di *coltura seminata* il ciclo dura di più, circa 130-150 giorni. Per quanto riguarda il terreno, questa pianta si adatta a una vasta gamma di tipi, purché ben drenati e di buona struttura, con pH compreso tra 5,5 e 8.

Il **frutto di pomodoro** è una bacca di forma e dimensioni molto varie (globosa, appiattita, allungata, ombelicata, liscia o costoluta) e queste caratteristiche dipendono principalmente dal tipo di cultivar.

La bacca assume colorazione generalmente rossa a maturazione per via dell'accumulo di un pigmento carotenoide chiamato licopene, ma esistono mutazioni o introgressioni di alleli selvatici che conferiscono colorazioni differenti come giallo, arancione, marrone e viola (Fig.11).



Figura 11. a) Varie forme e differenti colorazioni della bacca di pomodoro; b) Frutto di pomodoro in pianta.

La crescita della bacca procede piuttosto rapidamente, richiedendo circa 35-60 giorni per raggiungere la maturazione fisiologica, in relazione alla tipologia della bacca stessa e il *processo di maturazione* è caratterizzato da modificazioni morfologiche e biochimiche che portano alla formazione di composti quali carotenoidi responsabili del colore del frutto maturo, di molecole volatili responsabili dell'aroma e di zuccheri (Paran et al., 2007).

I processi metabolici che caratterizzano la maturazione sono dovuti all'attività di enzimi importanti quali la poligalatturonasi (PG) coinvolta nella degradazione della pectina della parete cellulare, e quindi responsabile dell'aumento di soffici ta della bacca durante la maturazione e della invertasi coinvolta nell'idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio e quindi responsabile dell'aumento del contenuto di solidi solubili.

Nel frutto maturo l'epicarpo risulta liscio e sottile, il mesocarpo polposo e sugoso e l'endocarpo costituito da tessuto placentare nel quale sono immersi i semi, pi  o meno numerosi (Fig.12).

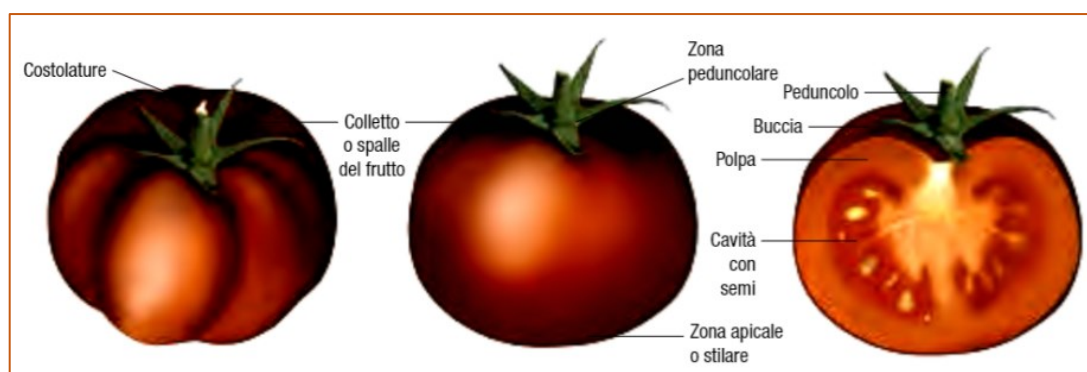


Figura 12. Struttura della bacca di pomodoro.

Nella polpa, contenuta nelle logge presenti in numero variabile (Fig.12), si trovano numerosi semi discoidali, schiacciati e, in relazione alle diverse cultivar, esiste in generale una correlazione diretta tra numero di semi e dimensioni della bacca (Soressi G., Mazzucato A., 2010).

I semi sono piatti, tondeggianti, ruvidi per la presenza di tegumento provvisto di peli, ricchi di lipidi, e di colore di norma giallo paglierino (Fig. 13). Esistono anche varianti a seme di colore bruno, chiamati “brown seed”, che è tipico del tegumento seminale delle specie selvatiche affini al pomodoro. Mille semi pesano 2,5-3,5 grammi.

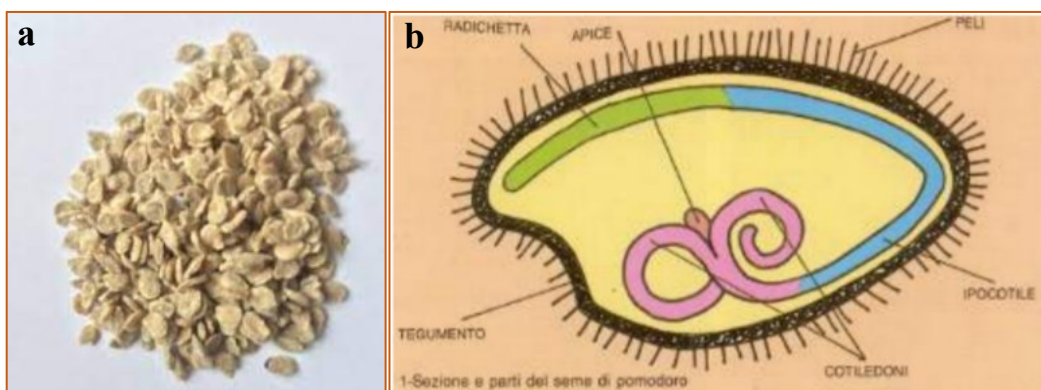


Figura 13. a) Semi di pomodoro; b) Sezione e parti del seme di pomodoro.

La formazione di frutti partenocarpici, ossia privi di semi in quanto sviluppatasi senza fecondazione, è possibile e, negli ultimi anni, è anche promossa nelle colture forzate in serra, dove le condizioni per la normale fecondazione non sono favorite ed è necessario effettuare appositi trattamenti ormonici per stimolare l'accrescimento dell'ovario in mancanza di fecondazione.

Il peduncolo che sostiene il frutto normalmente presenta una zona di abscissione che, suberificandosi, favorisce il distacco dei frutti giunti a maturazione. Esistono delle tipologie in cui questa zona di distacco manca e vengono chiamate *jointless*, nei quali i frutti restano attaccati a lungo alla pianta. I frutti del pomodoro hanno la seguente costituzione media: polpa e succo 95-96%, buccia 1-2%, semi 2-3%.

Un aspetto importante a cui si presta sempre più attenzione è la **qualità del frutto** di pomodoro che viene determinata mediante valutazione delle *caratteristiche fisico-chimiche*, quali la consistenza del frutto, pH, solidi solubili totali, e delle *caratteristiche organolettiche*, cioè il gusto, e la *caratteristica nutrizionale*.

In 100 grammi di prodotto fresco di pomodoro si registra mediamente il 95% di acqua, il 3% di zuccheri semplici (glucosio e fruttosio), l'1,2% di fibra, lo 0,2% di grassi e lo 0,9% di proteine (tab.3), quest'ultime due componenti concentrate soprattutto nel seme. Nonostante il pomodoro non sia particolarmente ricco di vitamine e di fitonutrienti, è però l'ortaggio più consumato, almeno in Italia, inoltre, a causa del relativamente alto contenuto in carotenoidi, è un'importante fonte di antiossidanti lipo-solubili nella dieta umana. La presenza del licopene nel plasma è stata, infatti, correlata alla riduzione del rischio del cancro alla prostata (Giovannucci et al., 1995) e altre

categorie di carotenoidi presenti nel pomodoro maturo comprendono β -carotene e piccole quantità di fitoene, fitofluene, δ -carotene, ζ -carotene, neorosporene e luteina (Khachik et al., 2002). Il pomodoro è anche un'importante fonte di antiossidanti idro-solubili, in particolar modo acido ascorbico (AsA) e fenoli.

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

Tabella 3. Valori nutrizionali e contenuto in nutrienti del frutto di pomodoro (USDA National Nutrient database)

1.1.3 Risorse genetiche

Il pomodoro è una delle specie orticole più diffuse al mondo e allo stato attuale la produzione mondiale si attesta intorno ai 126 milioni di tonnellate (Pirazzoli C., Palmieri A., 2010).

Nell'ultimo decennio si è avuta una considerevole crescita dei volumi raccolti valutabile intorno al 32% e questo fa comprendere l'importanza economica che questa pianta ha acquisito nel tempo, ma anche la pressione selettiva che l'uomo ha operato per avere un prodotto in maggiore quantità e, ultimamente, anche di maggiore qualità.

La domesticazione del pomodoro è stata particolarmente utile per la concentrazione di varianti alleliche che conferiscono caratteri agronomici di interesse, quali la perdita dei meccanismi naturali di dispersione, germinazione rapida, semi più grandi, dimensione e colore dei frutti, perdita di composti tossici e allergenici, *habitus* compatto e maturazione contemporanea, aumento della precocità, maggiore diversità morfologica e organolettica nei frutti (Damania A. et al., 2008).

Tuttavia, durante questo processo di selezione, la variazione allelica è stata ridotta sia a causa della selezione negativa verso i caratteri indesiderati sia attraverso una perdita di fenotipi/caratteri considerati neutri al momento in cui veniva effettuata la selezione stessa (Tanksley S. e McCouch S., 1997).

Il pomodoro coltivato ha dovuto affrontare, dunque, nel corso degli anni, molti fenomeni a “collo di bottiglia” che hanno portato ad una drastica riduzione della diversità genetica di questa specie (Fig.14).

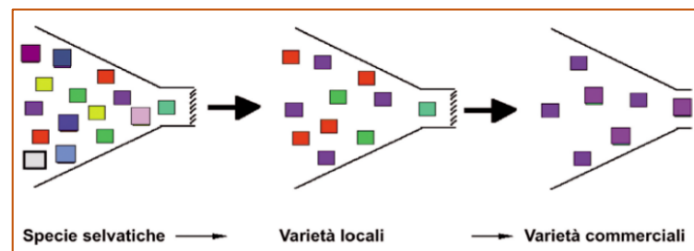


Figura 14. La continua selezione operata dall'uomo al fine di ottenere cultivar con caratteristiche desiderate ha causato la perdita di variabilità genetica.

Solanum Sect. *Lycopersicon* è un clade monofiletico relativamente piccolo all'interno della grande e diversificata famiglia delle Solanacee e consiste di 14 specie o sottospecie strettamente imparentate tra cui il pomodoro domestico, *Solanum lycopersicum* (ex *L. esculentum*) (L. C. Moyle, 2008, Fig.15).

Tutti i membri del clade sono diploidi strettamente correlati ($2n = 24$) che condividono un alto grado di sintenia genomica e sono in una certa misura incrociabili.

Una recente revisione tassonomica indica che *Lycopersicum* è annidato in *Solanum* e

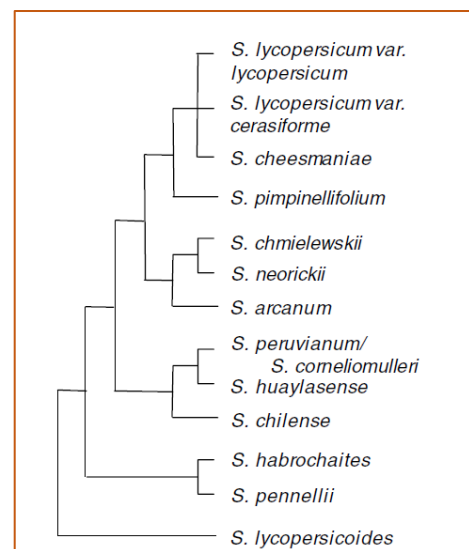


Figura 15. Schema della probabile relazione tra specie all'interno del clade *Solanum* sec. *Lycopersicon* (L.C. Moyle, 2008).

rinomina di conseguenza le specie *Lycopersicon* (Peralta e Spooner 2001).

La naturale diversità ecologica è così ampia nel gruppo *Lycopersicon* da renderlo eccezionalmente adatto all'analisi ecologica ed evolutiva sia a livello di popolazione che di specie.

L'ampia gamma di specie wild-type può essere ritrovata nella vasta zona compresa tra l'Ecuador e il Cile, ma anche lungo i pendii andini orientali e occidentali e nella regione costiera nord-ovest del Sud America. Una specie è stata individuata anche in Messico e perfino nelle Isole Galapagos, che posseggono una specie endemica tutta locale (L.C. Moyle., 2008).

È interessante comprendere il grado di identità e le maggiori differenze tra le specie coltivate e le specie wild-type come anche la grande diversità genetica, particolarmente evidente nella colorazione e dimensione dei frutti, tra le specie selvatiche del pomodoro (Peralta e Spooner, 2005; Bauchet e Causse, 2012).

Un'analisi comparativa così approfondita non è possibile se non grazie all'integrazione della genomica con le biotecnologie, con la bioinformatica e con i metodi convenzionali di miglioramento genetico e di mutagenesi. È proprio grazie all'utilizzo di queste nuove tecniche e mediante l'utilizzo sinergico di esse che si è ottenuto un considerevole progresso nella valorizzazione delle risorse genetiche vegetali (Monti L., 2008).

La possibilità di identificare e clonare i geni presenti nei genomi ha ampliato enormemente le fonti della variabilità genetica utilizzabile per il miglioramento genetico in pomodoro, inoltre l'avvento dei marcatori molecolari ha permesso di individuare più velocemente i caratteri di interesse agronomico, ma anche di comprendere la composizione dei caratteri più complessi determinati da QTL.

Gli interventi internazionali volti alla conservazione della biodiversità stanno garantendo la tutela di varietà locali e specie selvatiche di pomodoro, serbatoi di importanti caratteri di interesse agronomico e qualitativo. In un rapporto del 1987 si stimava che le accessioni di germoplasma di pomodoro e delle specie affini, conservate nelle banche del seme del mondo fossero pari a circa 32.000, ma attualmente sembra che tale numero abbia superato le 75.000 accessioni, mantenute in più di 120 Paesi (Soressi G., Mazzucato A., 2010). Ciò conferma l'importanza assunta dal germoplasma per il miglioramento genetico del pomodoro sia al giorno d'oggi che negli anni a venire.

In Italia, un'importante collezione di germoplasma di pomodoro è conservata presso il Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università della Tuscia di Viterbo e comprende circa 1000 accessioni che includono varietà antiche e moderne, italiane e straniere, varietà locali, breeding lines, mutanti monogenici singoli, doppi e multipli, specie selvatiche e altri stock genetici, ma altre collezioni sono mantenute presso l'Istituto di Genetica Vegetale (IGV) del

Consiglio Nazionale delle Ricerche con sede a Bari (Soressi G., Mazzucato A., 2010).

Ancora molto impegno è necessario per scongiurare l'erosione genetica dovuta allo sviluppo urbano e all'agricoltura intensiva che stanno distruggendo l'habitat naturale delle specie di pomodori selvatici (Bauchet e Causse, 2012).

Negli ultimi anni, mediante l'impiego delle tecniche di sequenziamento di ultima generazione, è stato possibile sequenziare, oltre al genoma del pomodoro coltivato, anche quello del pomodoro selvatico *Solanum pimpinellifolium*, specie conosciuta come “pomodoro ribes” e originaria delle isole Galapagos, a bacca rossa e con frutti piccoli, rotondi e commestibili, permettendo di tracciare la sua storia evolutiva e ampliare le conoscenze delle caratteristiche di diversità ed espressione genetica (Monti e Grillo, 2010; The Tomato Genome Consortium, 2012).

Grazie alla genomica comparativa è emerso che il genoma del pomodoro è improvvisamente andato incontro a una “triplicazione” (poliploidia), ma la maggior parte dei geni triplicati sono stati persi, mentre alcuni di quelli superstiti si sono specializzati e oggi controllano caratteristiche importanti della pianta, comprese quelle della bacca, come il tempo di maturazione, la consistenza e la pigmentazione rossa del frutto (The Tomato Genome Consortium, 2012).

Attraverso la generazione di mappe di associazione genomica e calcolando il linkage disequilibrium si è riuscito a stabilire il diretto antenato del pomodoro coltivato, che è stato individuato in *S. lycopersicum* var. *cerasiforme*, comunemente conosciuto come “*cherry tomato*”, per via del suo frutto rosso e tondo che rappresenta una forma intermedia tra quello caratteristico di *S. pimpinellifolium* ed il pomodoro coltivato con il quale presenta una stretta relazione genetica (Bauchet e Causse, 2012).

Tra le specie selvatiche, particolare importanza sta assumendo il *Solanum pennellii*, tipica del sud America, in particolare delle Ande, prospera in regioni molto aride mostrando estrema resistenza agli stress ambientali.

È proprio per via della sua estrema resistenza agli stress biotici ed abiotici, ma anche per i suoi frutti aventi quantità di TSS maggiori, che sempre più spesso viene utilizzata nei programmi di breeding, soprattutto nella creazione di linee di introgressione più resistenti e produttive. Il genoma di questa specie ha una grandezza di circa 1,2 Gb, contiene un potenziale set di 44966 geni in grado di codificare proteine e in media i geni contengono 5,7 esoni che codificano per proteine di 518 amminoacidi. Attraverso l’analisi delle sequenze EST, invece, si è rilevato che il 96% di queste sequenze di *S.pennellii* si allinea con quelle depositate per *S.lycopersicum*, mentre la maggior parte delle differenze sono rappresentate da SNPs che risiedono nei cromosomi 4, 5 e 11 e, in aggiunta, è

stato osservato che queste differenze non sono presenti solo tra *S.lycopersicum* e *S.pennellii*, ma anche tra il primo e le cv M82 e Heinz, tutte appartenenti alla stessa specie.

S.pennellii possiede una frequenza di LTR-RTs di recente origine molto alta rispetto a *S.lycopersicum* e ciò evidenzia la loro separazione da un comune antenato, dunque la loro appartenenza ad un unico clade. Altra differenza risiede nel numero di geni codificanti proteine carriers di acidi acilici, maggiore in *S.pennellii*, che risultano fondamentali per la sintesi di lipidi e quindi per la

formazione di una cuticola idrofobica più spessa che aiuta a minimizzare la traspirazione e, dunque, la perdita di acqua.

I frutti di *S.pennellii*, infatti, possiedono una cuticola tre volte più spessa e maggiormente densa di cere delle cultivar da serra e questa caratteristica si presenta quando il gene

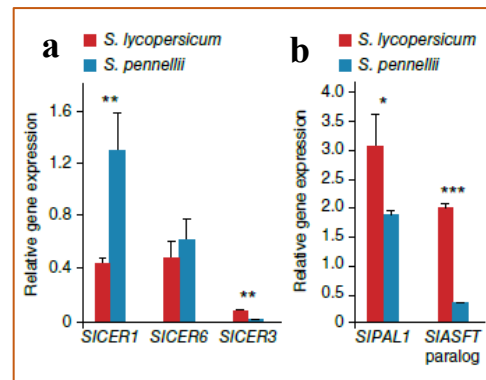


Figura 16. a) Espressione dei geni coinvolti nella biosintesi della cuticola della bacca di pomodoro; b) Espressione dei geni coinvolti nella produzione di cere della bacca (Bolger et al., 2014).

CER1 viene maggiormente espresso causando un incremento nella concentrazione di alcani sulla superficie del frutto (Fig.16). Nei frutti di *S.lycopersicum*, invece, sono i fenilpropanoidi ad essere più concentrati a causa di una espressione più efficiente del gene PAL1 che codifica per gli enzimi feruloiltransferasi (Bolger A. et al., 2014).

È stato verificato, mediante allineamento delle sequenze proteiche di *S.pennellii* con cv M82, che le sequenze amminoacidiche non variano molto, ma la maggior parte dei polimorfismi nelle strutture primarie proteiche risiedono a monte dei codoni di inizio dei geni per la resistenza allo stress.

Questi polimorfismi sono alla base della differenza di espressione genica tra le due specie.

Altre importanti differenze risiedono nella produzione di etilene, minore in *S.pennellii*, che causa una maturazione più lenta del frutto, nei geni correlati con la fotosintesi, espressi nei frutti maturi e più attivi in *S.pennellii* e nel metabolismo secondario. È stato constatato, infatti, che mentre il metabolismo primario non varia tra le due specie, il metabolismo secondario varia molto e coinvolge la produzione di zuccheri acilici, terpeni, sostanze volatili, carotenoidi e glicoalcaloidi. Quest'ultimi sono prodotti abbondantemente dalla pianta wild-type, probabilmente come mezzo di difesa, mentre i frutti presentano bassi livelli di licopene (Bolger A. et al., 2014).

La domesticazione prima e il breeding tra varietà coltivate poi, hanno portato ad una forte riduzione della variabilità genetica, mentre una notevole ricchezza di variabilità allelica esiste ancora nel germoplasma selvatico (Ladizinsky 1998).

Si può comprendere, dunque, come le specie wild-type e il loro studio genomico costituiscano la base per il miglioramento genetico e rappresentino dei veri e propri serbatoi di geni codificanti caratteri, sia qualitativi che quantitativi, di interesse agronomico.

Purtroppo, negli anni gli agricoltori non sono stati in grado di sfruttare le potenzialità delle specie selvatiche di pomodoro, nonostante la notevole variabilità sia allelica che di caratteri agronomicamente utili che queste specie presentano, costituendo così un prezioso pool genico (Tanksley e MacCouch 1997).

1.1.4 Caratteristiche qualitative: solidi solubili o grado Brix

Il contenuto di *solidi solubili totali* (TSS), anche conosciuto come ***grado Brix***, in pomodoro, così come in altre specie vegetali, è un **carattere quantitativo poligenico**, cioè controllato da più geni che interagiscono tra loro e ***multifattoriale***, cioè risultante dall'interazione dei geni con specifici fattori ambientali.

Su questo carattere, dunque, agisce una *variazione continua* causata dalla differente segregazione degli alleli dei vari geni che lo controllano ma anche da fattori ambientali, quali ad esempio lo stress idrico.

Nei frutti rappresenta uno degli aspetti in grado di determinare l'importanza economica del pomodoro insieme alla produzione totale.

Il contenuto zuccherino e il contenuto acidico costituiscono le componenti primarie dei TSS del frutto di pomodoro, rappresentando circa il 60% della materia secca (Atherton e Rudich, 1986), anche se i TSS sono rappresentati da tutte le sostanze contenute nel frutto eccetto l'acqua e i composti volatili.

In un pomodoro coltivato le quantità di solidi solubili (SS) e insolubili (ISS) rappresentano rispettivamente il 75% e il 25% di solidi totali e i solidi solubili rappresentano il 4 - 7.5% del suo peso fresco, anche se è stato visto che questa percentuale risulta essere decisamente più alta in alcune specie selvatiche (Fridman et al., 2000).

Il glucosio e il fruttosio sono i principali componenti dei SS, mentre la restante parte è composta dal saccarosio, in quantità molto piccole, acidi organici (acido citrico e acido malico), lipidi, minerali e pigmenti (Davies e Hobson 1981).

L'ISS include in questa categoria anche le proteine, la cellulosa, le pectine emicellulari, le pectine e i polisaccaridi in quanto determinanti la viscosità del frutto.

In generale le caratteristiche di gusto di un pomodoro vengono determinate prendendo in considerazione una serie di fattori meccanici, chimici ed ottici, che variano in base alla maturazione del frutto, questi includono l'aspetto (forma e colore), la struttura (determinata da contenuto di fibre), la consistenza (stadio di maturazione) e l'appetibilità (contenuto di sali, zuccheri, acidi e componenti volatili).

Fattori importanti ai fini dell'accettazione del prodotto da parte dei consumatori sono, perciò, le concentrazioni assolute degli zuccheri e degli acidi organici, come anche il rapporto tra le due, che risulta fondamentale essere equilibrato (Stevens et al., 1977). Tali sostanze, infatti, sono anche fattori essenziali per l'intensità del sapore in generale (Grandillo et al., 2004) ed è stato visto che la combinazione migliore, più saporita e, dunque, anche più accettata, è quella data da un alto contenuto di zucchero e un elevato contenuto di acidi.

Questo fenomeno trova la sua spiegazione nel rapporto che lega il valore dell'acidità e la percezione della dolcezza: la correlazione è infatti inversa, cioè all'aumentare dell'acidità del frutto diminuisce la percezione del sapore dolce, mentre a valori crescenti di Brix, ma ad acidità costante, la percezione del sapore dolce aumenta in maniera proporzionale (Tab.5). Ne segue che l'interazione fra contenuto in zuccheri e acidità titolabile determina un mascheramento della dolcezza: un frutto molto acido e mediamente ricco in zuccheri risulta meno dolce di un frutto poco dolce ma anche poco acido (Castellari L., 2002).

Acido/Zucchero e Gusto		
Acidità	Contenuto in zucchero	Gusto
Alta	Alto	Buono
Alta	Basso	Aspro
Bassa	Alto	Dolce
Bassa	Basso	Insapore

Tabella 4. Il rapporto tra la componente acidica e la componente zuccherina determina il gusto del frutto, dunque l'appetibilità per il consumatore.

Normalmente il pH misurato nei pomodori è compreso tra 4,0 e 4,5 e il sapore viene valutato da commissioni addette sulla base di caratteristiche quali odore, aroma, consistenza, succo, granulosità, consistenza della buccia, acidi e zuccheri. In generale, i pomodori più piccoli, quelli ciliegini, hanno un maggiore grado Brix e sono dunque più dolci (Tab. 4).

	Valore °Brix
<i>Pomodoro a ciliegia o grappolo</i>	6-10
<i>Pomodoro comune o tondo</i>	3,5-5,5

Tabella 5. Grado Brix del pomodoro ciliegino e del pomodoro comune. I valori rilevati sono estremamente differenti tra loro.

In alcuni paesi sono stati stabiliti dei limiti quantificabili per determinare il sapore della bacca. In Francia, ad esempio, si preferisce avere un rapporto di zucchero/acidi pari a 10 e un contenuto di acidi pari a 5 g di acido citrico idratato/L (www.yara.it), mentre in Italia i pomodori destinati alla trasformazione richiedono un grado Brix minimo pari a 4,5, mentre nei pomodori freschi l'intervallo accettabile è di 4,0 - 5,5.

Anche i composti volatili contribuiscono all'aroma e al sapore, in particolare sono state individuate 400 molecole classificabili come composti volatili in pomodoro e alcune di queste derivano dall'ossidazione dei carotenoidi, anche se sono disponibili pochi dati riguardo questo aspetto e le molecole analizzate sono ancora pochissime.

Diversi studi hanno dimostrato l'influenza di fattori quali la varietà, lo stadio di maturazione e le condizioni di conservazione sulle sostanze aromatiche più importanti (Grandillo et al., 2004).

La quantità di solidi solubili, infatti, risulta essere un parametro chiave nell'industria della trasformazione in quanto la disponibilità di frutti molto dolci permette di aggiungere quantità minori di zucchero durante la

lavorazione; tutto ciò giustifica l'interesse considerevole nella manipolazione del contenuto di solidi solubili delle varietà di pomodoro (Baxter et al., 2005). Il grado Brix del prodotto finito è solitamente misurato dai produttori durante processo di trasformazione mediante l'utilizzo del rifrattometro.

Nel mercato del pomodoro fresco, più alto è il contenuto di solidi solubili più il prodotto acquista un maggiore valore commerciale, infatti all'aumento del contenuto zuccherino è associato anche un aumento del contenuto in vitamine e sostanze aromatiche e anche una maggiore conservabilità del prodotto (shelf-life). Per questi motivi, l'aumento di solidi solubili è stato l'obiettivo di numerosi programmi di breeding (Foolad, 2007).

1.2 Miglioramento genetico del pomodoro

Il miglioramento genetico del pomodoro è un processo che ha origini antiche, infatti le prime fasi della ***domesticazione*** sono state operate inconsapevolmente dagli Indios, sfruttando l'ampia variabilità presente e permettendo una maggiore riproduzione delle piante con caratteri desiderati, quali mutazioni a carico della forma, delle dimensioni, della pigmentazione e, soprattutto, della commestibilità, cioè della perdita di alcaloidi della bacca, nonché di una maggiore autofertilità dovuta a una più idonea struttura florale.

Il Messico risulta, dunque, oltre che il centro di domesticazione, anche il centro di diversificazione primario del pomodoro coltivato.

A questa primaria domesticazione segue un miglioramento genetico su ***base empirica***, tra il XVI-XIX secolo, promosso in Europa, Spagna e Italia per prime, permesso dall'ampia variazione pedoclimatica propria dell'areale mediterraneo e dall'aumentata e più frequente autocompatibilità, necessaria per la riproduzione data la scarsità di pronubi impollinatori. La nuova pianta presenta ora fiori privi di nettarii che non risultano appetibili per il pronubo domestico per eccellenza di quelle zone, l'ape. Questa seconda fase del miglioramento genetico del pomodoro è stata operata inconsciamente dagli orticoltori-coltivatori, soprattutto del Sud Italia, e si fa più forte la selezione per il carattere "***stigma inserto***" che ha consentito la quasi completa autogamia e

garantendo la massima fertilità delle piante necessaria per la loro riproduzione. Si è agito, dunque, sulle progenie segreganti, frutto di occasionali incroci, consentendo la formazione di numerose popolazioni locali che si sono differenziate nel tempo. L'affermarsi della destinazione industriale ha decretato l'inizio di un sistematico ed efficace lavoro di selezione sugli ecotipi locali di pomodoro, per primo il San Marzano, basato sulle progenie di singola pianta (*selezione per linea pura*). Il miglioramento genetico si è arricchito della possibilità di introdurre deliberatamente variabilità attraverso *l'incrocio controllato*, che ha consentito di mescolare e ricombinare desiderate caratteristiche di tipologie diverse di differente provenienza geografica e adattamento (Soressi G., Mazzucato A, 2010).

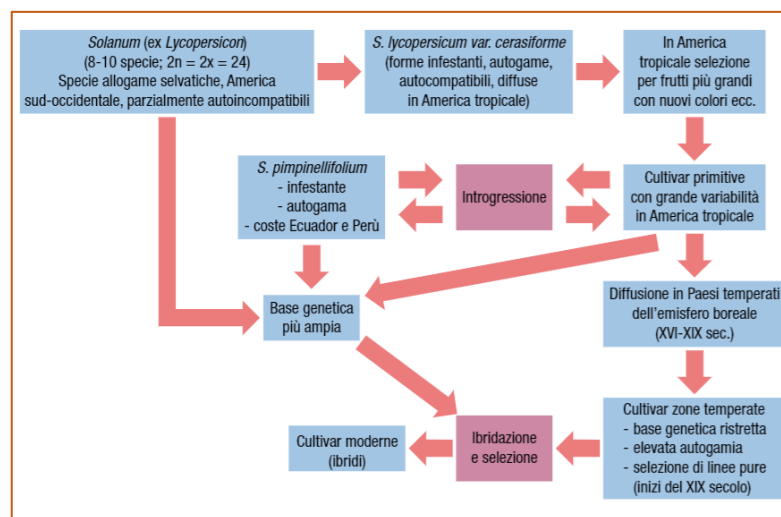


Figura 17. Evoluzione del pomodoro in coltivazione tramite miglioramento genetico empirico prima e scientifico poi (Soressi G. e Mazzucato A., 2010).

Dal XX secolo, in Italia, il miglioramento del pomodoro è avanzato con il continuo apporto di variabilità genetica sia di singole mutazioni capaci di conferire caratteristiche d'interesse, solo spontanee prima e indotte mediante mutagenesi fisica e chimica poi, sia da incroci con accessioni di specie selvatiche, donatrici di caratteri a eredità semplice (monogenici) o più o meno complessa (oligogenici o poligenici).

Attualmente i genetisti dispongono di oltre 700 caratteri, sia semplici che poligenici, che possono essere utilizzati per il miglioramento genetico (Foolad, 2007).

Il miglioramento genetico del pomodoro, in passato, puntava principalmente all'ottenimento di varietà altamente produttive, con prodotti di elevata pezzatura e di bell'aspetto per attrarre il consumatore realizzando un prodotto che era privo di sapore e poco nutriente.

A partire dagli anni '50, però, si è posta maggiore attenzione alla qualità del prodotto e gli obiettivi sono stati spostati sull'ottenimento di cultivar di ottima resa, con elevate caratteristiche qualitative e crescenti standard di salubrità sia per il consumatore sia per l'ambiente (Saccardo e Crinò, 2003).

Oltre a tener presenti le caratteristiche più commerciali, cioè tutti i parametri che rendono il prodotto facilmente vendibile, ovvero forma, colore, uniformità del calibro, si prendono dunque in considerazione anche le caratteristiche

organolettiche, cioè l'insieme delle proprietà percepibili dai nostri sensi (sapore, odore, sensazioni visive) e quelle nutrizionali, che tengono conto della quantità e della qualità degli elementi nutraceutici presenti nel frutto, come vitamine ed antiossidanti, come anche quelle sanitarie per le quali i frutti immessi sul mercato devono essere privi di sostanze tossiche, secondo le normative vigenti.

Negli ultimi anni il pomodoro è stato molto utilizzato nel miglioramento genetico biotecnologico per la produzione di *piante transgeniche*, questo perché si è dimostrato una pianta molto versatile. Essa, infatti, è stata la prima specie coltivata in cui una strategia basata sulla transgenesi si è tradotta in un prodotto effettivamente arrivato sul mercato.

Si è trattato di una linea dotata di maturazione ritardata il cui fenotipo è stato ottenuto grazie al silenziamento del gene che codifica per l'enzima poligalatturonidasi. Il fenotipo così trasformato è stato nominato Flavr-Savr™ ed è stato commercializzato negli USA proprio per via delle sue peculiari caratteristiche che consistono in una bacca con maggiore consistenza e con migliori caratteristiche organolettiche e che ha un rallentamento nel processo di rammollimento.

1.2.1 Obiettivi del miglioramento genetico

Il principale obiettivo del miglioramento genetico in pomodoro è la costituzione di varietà con caratteristiche differenti da quelle coltivate in termini di produttività, di qualità del prodotto (forma, dimensione, colorazione, consistenza, sapore del frutto), di adattamento ambientale (epoca di raccolta, coltura protetta o in pieno campo, resistenza a stress biotici e abiotici), ma anche di destinazione commerciale (da industria, per il mercato del fresco o “multi-purposes”).

La disponibilità di un pool genico con ampia variabilità genica a cui attingere risulta una condizione imprescindibile per il raggiungimento di questi obiettivi, da ciò si può dedurre come la riduzione della variabilità genetica del pomodoro coltivato, confermata anche dall’impiego di marcatori molecolari, risulti essere la causa principale degli esigui risultati prodotti dai processi di breeding fino al 1940 circa, anno in cui viene riportato il primo caso di utilizzo delle specie selvatiche per il miglioramento di caratteri utili (Bohn e Tucker 1940; Mazzucato et al. 2008).

Successivamente, grazie all’utilizzo del germoplasma di specie selvatiche è stato osservato un aumento delle rese ottenute operando incroci interspecifici mirati (Rick 1988). A seguito dei successi ottenuti attraverso l’utilizzo di specie wild-type, sono stati condotti numerosi studi al fine di caratterizzare le specie

selvatiche per importanti caratteri relativi alla qualità ed alla resistenza/tolleranza a stress biotici (Foolad 2007; Grandillo et al. 2011, Peralta e Spooner 2008). Complessivamente, sono state individuate resistenze a 42 agenti patogeni nel germoplasma selvatico e almeno 20 di queste sono state introgressate con successo nel pomodoro coltivato (Rick e Chetelat 1995; Robertson e Labate 2007).

Attualmente è stato visto che gli ibridi commerciali più diffusi portano fino a quindici combinazioni indipendenti di geni di resistenza, derivanti da suddette specie selvatiche (Zamir et al., 2001).

La **produttività** della coltura è stata da sempre uno degli obiettivi principali, nonché uno dei caratteri per cui si sono registrati i maggiori successi. Si ritiene, infatti, che la produttività media delle cultivar da industria negli Stati Uniti tra il 1920 e il 1990 sia passata da 10 a oltre 70 t/ha e il 50% di questi aumenti nella produzione sono stati ottenuti mediante miglioramento genetico.

Altro obiettivo è il **periodo di fioritura e di maturazione** delle bacche, caratteristica importante sia per le cultivar da tavola sia per quelle da industria. A questo riguardo esistono differenze genetiche che permettono colture precoci, medio-precoci e tardive con le quali è possibile estendere il periodo di raccolta sia per il pomodoro da mensa sia per quello da industria, al fine di ottimizzare l'organizzazione dell'attività di trasformazione.

Altro carattere dal controllo poligenico, dunque di difficile controllo, è la **consistenza** della bacca, ma comunque modifiche a questo carattere sono state introdotte a partire dagli anni '40 del secolo scorso nelle moderne varietà utilizzando principalmente *S.pimpinellifolium*.

La consistenza della bacca unitamente alla **resistenza alla sovraturazione** sono risultati caratteri decisivi nello sviluppo delle moderne coltivazioni da industria che fanno uso esclusivo della raccolta meccanica in unica soluzione (Soressi G., Mazzucato A, 2010). La consistenza, nelle varietà da mensa, risulta una delle componenti della serbevolezza o “shelf life” e viene definita come la capacità del frutto di mantenersi a lungo turgido anche dopo il distacco dalla pianta.

Un obiettivo ambizioso del miglioramento genetico consiste nell'aumento complessivo della **qualità** agendo contemporaneamente su più caratteri, come il contenuto in sostanze di interesse nutrizionale, le caratteristiche fisico-chimiche e quelle organolettiche, non solo in condizioni di crescita ottimali, ma anche in condizioni avverse, aumentando, dunque, la tolleranza agli stress biotici ed abiotici.

Un incremento della qualità organolettica e nutrizionale del frutto costituisce un difficile obiettivo da raggiungere per il breeding a causa della natura poligenica di molti dei caratteri di interesse, l'utilizzo dei moderni strumenti di

genomica avanzata offrono spesso la possibilità di raggiungere tale obiettivo controllando la piramidizzazione di alleli, geni e QTL favorevoli in un unico genotipo.

Eppure, la comprovata relazione tra un alto consumo di pomodoro e il ridotto rischio di alcuni tipi di cancro come anche l'abbassamento dell'incidenza di cardiopatia ischemica ha alzato il livello di attenzione proprio su questa caratteristica (Javanmardi J. et al., 2006).

Tra i diversi caratteri che determinano la qualità del frutto, perciò, particolare importanza riveste il contenuto di sostanze quali vitamine, minerali, sostanze antiossidanti e antitumorali.

Il *contenuto di antiossidanti* risulta essere più elevato proprio nelle cultivar wild-type che sono spesso coinvolte in programmi di miglioramento genetico finalizzato al trasferimento di questa caratteristica nel pomodoro coltivato, utilizzando metodi tradizionali di breeding (Ronen et al., 1999), ma anche l'ingegneria genetica (Romer et al., 2000; Butelli et al., 2008).

Il potere antiossidante della bacca di pomodoro dipende principalmente dal suo contenuto in licopene, il pigmento carotenoide responsabile del colore rosso, con spiccato potere antitumorale. Tuttavia, il pomodoro è anche una ricca fonte di altre sostanze come il beta-carotene (provitamina A), la vitamina C, la vitamina E ed i polifenoli/flavonoidi (Javanmardi J. et al., 2006).

Anche la quantità di *solidi solubili totali* è stata considerata come una caratteristica importante per la determinazione della qualità del prodotto.

Un maggior contenuto in TSS significa avere un prodotto con qualità nutritive migliori, come anche un sapore più intenso e una shelf-life e compattezza maggiori.

Anche in questo caso è stato osservato che la quantità di solidi solubili nelle specie wild-type può raggiungere il 15% del peso fresco del frutto e questo valore risulta essere tre volte più alto di quello registrato nelle varietà coltivate.

1.2.2 Miglioramento genetico convenzionale: le linee di introgressione per il grado Brix

Per incroci convenzionali, o “**Conventional Breeding Techniques**” (CBT), si intende l’applicazione integrata dei principi della genetica classica e della genomica attraverso la selezione visiva e/o molecolare con strumenti non-GM, cioè che non causano modificazione genetica.

In pomodoro si utilizzano principalmente quattro metodi: l’incrocio intraspecifico (o propriamente detto), l’incrocio tra ibridi, ibridazione introgressiva e mutagenesi (Bai Y., 2017).

Per ***incrocio intraspecifico*** si intende l’incrocio tra due individui appartenenti ad una stessa specie. In campo agrario ciò implica il prelievo di polline da un genotipo appartenente ad una determinata cultivar al fine di fecondare l’ovocellula di un altro genotipo, appartenente alla stessa cultivar o ad una cultivar differente.

Il pomodoro è una pianta autogama, dunque in natura l’impollinazione può essere anemofila o favorita dai pronubi più comuni quali api e bombi, ma nel miglioramento genetico convenzionale si preferisce operare una *impollinazione controllata* operata **manualmente**, portando le antere o il polline raccolto dai fiori sullo stigma del portaseme, oppure utilizzando **insetti pronubi** allevati ad hoc (Tab.6).

Al fine di ottimizzare gli incroci, spesso i fiori della pianta madre vengono **emasculati**, cioè vengono rimosse le parti maschili, isolati ed impollinati a mano al momento della maturazione della parte femminile con polline raccolto dalla pianta maschile desiderata.

La distribuzione del polline viene fatta tramite un pennellino o scuotendo il polline dal donatore maschile sui fiori femminili così che raggiunga lo stigma.

Per questa tecnica, la sincronizzazione tra fiori del donatore e del ricevente è molto importante perché lo stigma, come il polline, è recettivo e vitale solo per poco tempo. Per ovviare a questo problema, vengono spesso impiegate semine scalari, o in alternativa, essiccazione e congelamento del polline fino a quando la pianta madre è pronta.

<p>1</p>  <p><i>Il fiore di una pianta selezionata di pomodoro viene emasculata...</i></p>	<p>3</p>  <p><i>Il polline raccolto viene trasferito sullo stigma della piante emasculata per la fecondazione. Questo incrocio artificiale pone le basi della variabilità genetica che si esprimerà nella progenie.</i></p>
<p>2</p>  <p><i>... allo stesso tempo viene raccolto il polline di un'altra pianta selezionata.</i></p>	 <p><i>La progenie viene selezionata per più generazioni secondo criteri specifici, e.g. resistenza alle malattie, gusto o produttività, per arrivare ad una nuova varietà stabile.</i></p>
<p>5</p>  <p><i>Dopo un lungo periodo di prove e valutazioni, la nuova varietà viene riconosciuta, iscritta e propagata ...</i></p>	<p>6</p>  <p><i>... per ottenere semente commercializzabile.</i></p>

Tabella 6. Le varie fasi dell'impollinazione controllata operata manualmente (Rete Semi Rurali, 2019).

Se la variabilità genetica all'interno di una specie coltivata non è sufficiente a garantire che emergano nuove combinazioni potenzialmente interessanti tramite l'incrocio tra individui al suo interno, si può ricorrere all'incrocio tra due specie diverse e ciò viene definito **incroci tra ibridi**.

Le specie imparentate, coltivate o selvatiche, possono essere incrociate tra loro in modo più o meno laborioso, mentre specie più distanti hanno un ridotto sviluppo dell'endosperma nel chicco che causa un carente sviluppo dell'embrione.

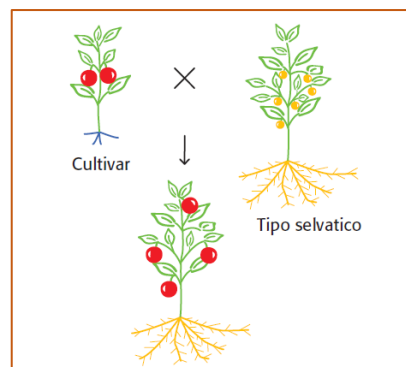


Figura 18. Incrocio inter-specifico (Rete Semi Rurali, 2019).

Per aumentare la frequenza di embrioni vitali, si

usano quindi diverse tecniche in vitro. Negli incroci interspecifici (Fig.18), i genomi coinvolti possono parzialmente unirsi, dando luogo spontaneamente a specie allo-aploidi (Rete Semi Rurali, 2019). Le prime produzioni di ibridi commerciali iniziano già dalla metà del XX secolo e questo commercio di semi ibridi deriva da una caratteristica tipica del pomodoro che consiste nell'effetto eterotico o **vigore ibrido**, che altro non è che l'incremento in dimensioni, vigore, fertilità e produttività di un ibrido rispetto alla media dei parentali.

Il pomodoro ha un enorme potenziale di eterosi per precocità, resa totale e resistenza agli stress biotici ed abiotici. Il primo approccio verso una produzione su larga scala di colture ibride di pomodoro è stato operato in

Bulgaria grazie a Doskellaf che, nel 1912, creò la prima cultivar di pomodoro F1 avente una resa totale maggiore rispetto alle cultivar parentali e le restanti cultivar standard della zona (Cheema D.S., 2005).

L'effetto eterotico è positivamente correlato al numero di loci eterozigoti dell'ibrido, perciò generalmente risulta maggiore all'aumentare della distanza genetica tra i parentali, ma per generare l'interesse del breeder, non basta che l'ibrido abbia performance superiore alla media dei parentali, esso, infatti, deve risultare superiore al migliore dei due parentali.

Vengono utilizzati principalmente tre metodi per produrre semi ibridi: 1) emasculazione ed impollinazione manuale; 2) sterilità maschile e l'impollinazione manuale; 3) sterilità maschile e dell'impollinazione naturale (Cheema D.S., 2005).

La prima procedura prevede l'emasculazione e l'impollinazione, e risulta estremamente laboriosa poiché deve essere effettuata totalmente in modo manuale a causa della morfologia floreale favorevole che permette l'asportazione di tutto l'androceo con delle pinzette appena prima dell'antesi del fiore. Essendo un lavoro estremamente minuzioso, lungo e del tutto manuale, le ditte sementiere tendono a realizzare la produzione del seme F1 in Paesi dove il costo della mano d'opera è contenuto. Questa tecnica è comunque commercialmente accettata poiché in colture come quella del pomodoro ogni

frutto fornisce un numero ragionevolmente elevato di semi (Soressi G., Mazzuccato A, 2010).

La crescita delle colture deve essere attentamente monitorata e si deve prestare particolare attenzione all'irrigazione e alle pratiche di fertilizzazione, poiché l'umidità e lo stress da nutrienti possono ridurre la produzione di frutti e semi.

La resa dei semi varia dipende molto, comunque, dal tipo di cultivar.

Le altre due tecniche si avvalgono della sterilità maschile che in pomodoro può essere di quattro tipi: 1) polline sterile; 2) assenza di stami; 3) sterilità posizionale; 4) sterilità funzionale (antere non deiscenti) (Fig.19). Ognuno di questi caratteri è governato da un singolo gene recessivo (Cheema D.S., 2005).







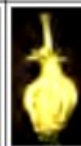
Nome	Wild type	Stamen-less-2	Variable male sterile	Apetalous	Pistillate	Positional sterile	7B-1
Aspetto							
Simbolo	WT	sl-2	vms	ap	pi	ps-2	7B-1
Interesse pratico		++	+	?	-	+++	+++

Figura 19. Elenco di mutazioni di maschiosterilità genetica che hanno ricevuto attenzione per la loro possibile applicazione nella produzione del seme ibrido (Soressi G., Mazzuccato A., 2010).

Le piante che non hanno stami producono spesso bacche deformi nella generazione ibrida F1 e la sterilità non è un carattere stabile, dunque è una tipologia di maschiosterilità che non viene molto usata.

La sterilità funzionale e del polline, invece, sono le due tecniche maggiormente utilizzate in quanto il carattere di sterilità rimane stabile attraverso back crossing e si ricorre spesso all'impiego, nel polline abortivo, di marcatori morfologici quale, ad esempio, il carattere recessivo "aa" per le antocianine.

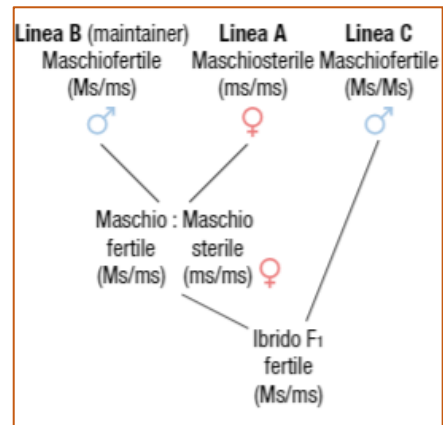


Figura 20. Schema per l'uso di mutazioni recessive di maschiosterilità genetica per la produzione di seme ibrido (Soressi G., Mazzuccato A., 2010).

Sebbene gli ibridi siano estremamente richiesti e costituiscano un mercato molto produttivo, il loro principale difetto risiede nella breve durata e nella non riproducibilità, che costringe gli agricoltori ad acquistare ogni anno nuove sementi.

La **mutagenesi indotta** consiste nell'esposizione di parti di pianta (semi, polline, tuberi o apici vegetativi) o piante intere alla fonte mutagenica per aumentare il tasso di mutazione. Gli agenti mutageni possono essere di natura *chimica*, tendendo a causare soprattutto mutazioni puntiformi, o *fisica*.

Tra i primi si annovera la **colchicina** che causa la duplicazione dell'intero corredo cromosomico, ovvero una mutazione a livello genomico, mentre per i secondi si hanno le *radiazioni ionizzanti*, in grado di provocare rotture cromosomiche causando mutazioni a livello di intero cromosoma come le delezioni, le traslocazioni, le inversioni o le duplicazioni di unità

cromosomiche. La maggior parte delle mutazioni indotte con queste tecniche hanno effetti negativi o letali e solo una piccola percentuale di piante mutanti presenta un potenziale interessante per successivi stadi di miglioramento.

La mutagenesi indotta è usata soprattutto quando si vuole migliorare un singolo carattere sotto il controllo di un solo gene, aumentando artificialmente il tasso di mutazione casuale, infatti, aumenta anche la probabilità di generare variazioni geniche puntiformi che danno luogo a nuovi caratteri (Soressi G., Mazzucato A, 2010).

L'*ibridazione introgressiva* consiste nel passaggio di geni da una specie all'altra attraverso una barriera interspecifica incompleta che causa una modifica genetica che può essere fissata mediante backcross ripetuto (Fig.21) (Kesara Anamthawat-Jónsson, 2001).

Le **Linee di Introgressione** (Introgression Line o "*IL*") derivanti da questa procedura, basata dunque su cicli di reincrocio, mostrano genomi identici che differiscono per una sola regione, definita *regione di introgressione*, perciò qualsiasi variazione fenotipica che si osserva è sicuramente data da quella specifica variazione.

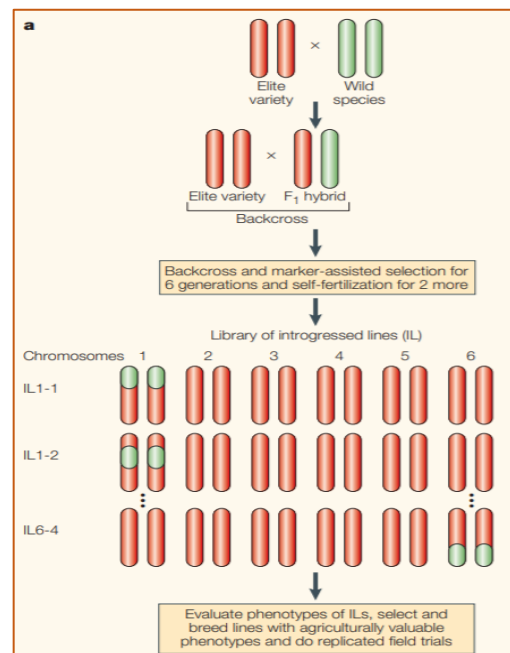


Figura 21. Schema riassuntivo della formazione di una linea di introgressione (Zamir D, 2001).

Se ne deduce che le linee generate con questa tecnica contengono singoli segmenti di cromosoma di una specie selvatica affine inseriti in condizione di omozigosi nel contesto genomico della specie coltivata (Eshed Y. and Zamir D., 1994). Considerando le proprietà delle popolazioni IL e le potenzialità del germoplasma selvatico come risorsa di variabilità genetica, le IL rappresentano uno strumento importante per accelerare il processo di breeding del germoplasma coltivato basato sul trasferimento di caratteri utili contenuti nelle specie selvatiche. Lo sviluppo delle IL è stato reso possibile dall'avvento dei marcatori molecolari e permette sia l'analisi di QTL estesa ad interi genomi sia la mappatura fine dei QTL, permettendo così di dissezionare la variabilità genetica ad essi associata e di identificare un numero elevato di QTL di interesse (Paterson et al., 1990; Eshed Y. and Zamir D., 1995).

È proprio attraverso la **selezione assistita da marcatori molecolari** (MAS) delle IL che si riesce a definire la posizione delle introgressioni del parentale donatore nel genoma del parentale ricorrente e la disponibilità crescente di numerose tecnologie innovative per lo screening con marcatori molecolari ha reso più efficiente tale processo, tanto che le IL possono essere completate dopo 10 generazioni di reincrocio assistito da marcatori molecolari (Young N.D., 1999; Peleman e van der Voort, 2003).

Attualmente i marker molecolari più utilizzati sono RFLP, RAPD, AFLP e i microsatelliti ai quali si affiancano tecniche di visualizzazione quali l'ibridazione genomica in situ (“genomic *in situ* hybridization-GISH”) e la “dispersed DNA sequences” (dFISH), che hanno come fine quello di individuare e mappare le introgressioni presenti sui cromosomi.

Da ciò si evince che l'individuazione dei geni desiderati deve precedere gli incroci tra le varie linee (Kesara Ananthawat-Jönsson, 2001).

Un altro aspetto importante da valutare sono le interazioni che intercorrono tra QTL e ambiente che devono essere verificate e stimate mediante l'analisi fenotipica in repliche multiple e in luoghi diversi al fine di ridurre gli effetti ambientali (Eshed Y. and Zamir D. 1996; Monforte A.J. et al. 2001).

Tratti di interesse commerciale quali la resa, la qualità del prodotto e la risposta agli stress della coltura mostrano modelli di ereditarietà complessi che risultano dalla segregazione di numerosi QTL che interagiscono a loro volta fra loro e l'espressione dei quali viene modificata proprio dall'ambiente.

L'integrazione dei dati provenienti da studi indipendenti permette di creare un database dei dati fenotipici di ciascuna linea (Zamir D., 2001).

Il pomodoro è stata la coltura pioniera nell'introgressione diretta di segmenti cromosomici wild-type associati a QTL che migliorano la qualità dei frutti. Un gene importante che è stato introdotto in una specie coltivata è stato quello che

regola il livello di provitamina A o β -carotene nel frutto. Questo gene è proprio della specie wild-type *Lycopersicon pennellii* e il risultato ottenuto è stato quello di valori β -carotene 15 volte maggiori rispetto alla specie coltivata (Zamir D., 2001). Altre linee di introgressione sono state realizzate utilizzando la specie selvatica *Solanum chmielewskii*, originaria del Perù, caratterizzata da frutti con alto grado Brix. Questo specifico carattere è stato introgredito in varietà coltivate determinando l'innalzamento del contenuto in solidi solubili nella bacca (Rick C.M., 1974; Tanksley S.D. and Hewitt J., 1988).

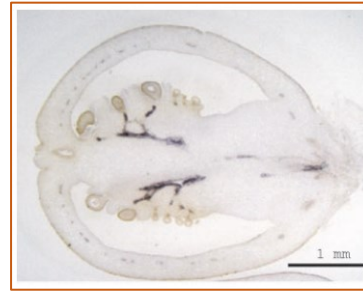
Sempre per quanto riguarda il grado Brix, sono state realizzate linee di introgressione incrociando la varietà commerciale M82 di *Solanum lycopersicum* con la linea LA0716 di *Solanum pennellii* e ciò ha permesso di caratterizzare e mappare il QTL presente all'interno di un gene specifico, il gene Lin5.

Lin5 (*Solyc09g010080.2*) codifica per una invertasi di parete apoplastica (CW-invertase) chiamata anche beta-fruttofuranosidasi, che è un isoenzima di tipo 1 insolubile specifico per il legame β -D-fruttofuranosidico e che catalizza l'idrolisi nei due esosi D(+)-glucosio e D(-)-fruttosio.

Il gene ha una lunghezza di 3864 bp ed è contenuto nel cromosoma 9 estendendosi dalla posizione 3475480 alla posizione 3479343 (<https://solgenomics.net>) e viene espresso durante il primo stadio dello sviluppo

del frutto, in particolare nella placenta di quest'ultimo, nel pericarpo durante la fase iniziale della divisione cellulare e nel tessuto conduttore dell'ovario nel fiore, dunque in tutti tessuti non fotosintetici (Fig.22) (Fridman et al., 2000, 2002, 2004).

Figura 22. Visualizzazione in situ dei trascritti del gene LIN5 in una sezione longitudinale di un ovario all'antesi. Si può vedere come l'espressione del gene avviene soprattutto nei tessuti conduttori all'interno della placenta come anche intorno al pericarpo circostante (Fridman et al, 2004).



Questa invertasi è un membro di una famiglia più grande che comprende i geni LIN6, LIN7 e LIN8 (Fig.23) che codificano allo stesso modo delle invertasi di parete, tutte atte a catalizzare l'idrolisi del saccarosio e risultano quindi responsabili del contenuto in solidi solubili del frutto.

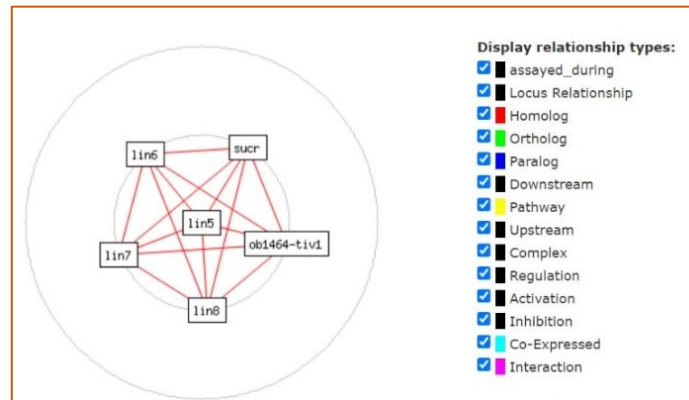


Figura 23. Relazioni genetiche tra l'invertasi codificata dal gene LIN5 e le altre invertasi presenti nel frutto di pomodoro e non solo.

L'invertasi nell'apoplasto svolge una duplice funzione: 1) scinde il saccarosio negli organi sink, mantenendo un gradiente negativo costante di modo che si

abbia un uptake maggiore di questo zucchero dal floema (Fig.24); 2) agisce innescando un meccanismo attraverso il quale lo zucchero funge da segnale per integrare le risorse e il metabolismo sink (Fig.25) (Sturm and Tang, 1999).

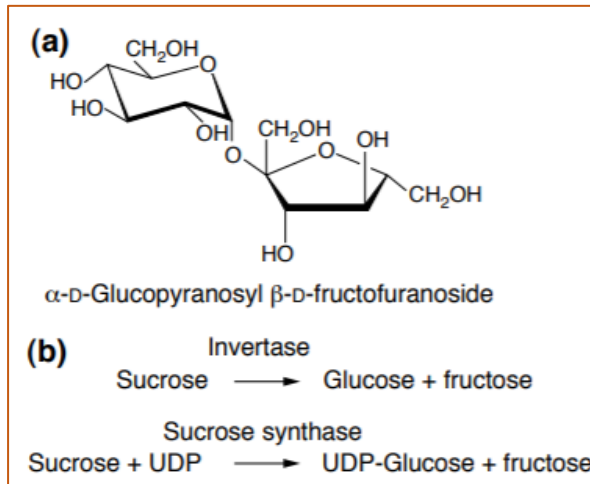


Figura 24. a) Il disaccaride saccarosio è il substrato d'elezione delle invertasi presenti nelle piante; b) Reazione catalizzata dall'enzima invertasi (Sturm and Tang, 1999).

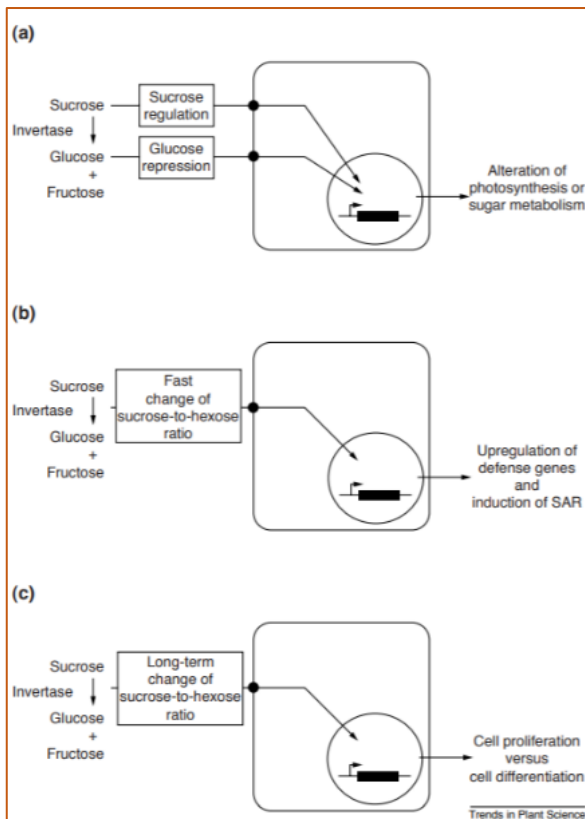


Figura 25. Tre differenti pathway di segnalazione esistenti nelle piante e che si basano sul tipo e la quantità di zuccheri presenti. Modifiche della composizione zuccherina alterano l'espressione genica a cui seguono delle risposte fisiologiche della pianta. Le cellule vegetali sembrano rilevare non tanto la quantità di saccarosio e glucosio nel citosol quanto l'afflusso di queste molecole (Sturm and Tang, 1999).

Nel locus LIN5 del *S. pennellii* sono stati individuati due QTL molto vicini fra loro, separati da soli 0,3 cM di distanza, il ***Brix9-2-5*** e il ***PW9-2-5*** che vengono espressi in situazioni ambientali, fisiologiche e genetiche differenti.

Il QTL *PW9-2-5* è specifico per il germoglio e ne altera la crescita causando un aumento della massa vegetale, della resa e in parte anche dei solidi solubili (Fridman et al. 2002), mentre il QTL *Brix9-2-5* si trova in una regione di 484 bp nell'intervallo tra il terzo esone e il terzo introne che presenta singole sostituzioni nucleotidiche e codifica per un residuo amminoacidico vicino al sito di legame fruttofuranosidico dell'enzima (Fridman et al., 2002- 2004).

La *IL9-2-5* contiene un'introggressione di 9 cM sul cromosoma 9 proveniente dalla specie wild-type di *Solanum pennellii* che permette alla pianta di produrre frutti maturi con alto contenuto di solidi solubili (TSS) (Eshed and Zamir, 1995).

Attraverso studi di mutagenesi sito-specifica è stata evidenziata la capacità di singole sostituzioni nucleotidiche di conferire una diversa affinità per il saccarosio ($K_{m_{\text{Saccarosio}}}$) e ciò conferma l'aspetto evidenziato nei frutti della *IL9-2-5*, portante l'allele LIN5 del *S. pennellii*, nella quale sono stati rilevati livelli di uptake dello zucchero maggiori rispetto a quelli delle varietà coltivate (Baxter et al., 2005).

L'analisi di ricombinazione delle linee di introgressione ha dimostrato che le differenze dei tre amminoacidi nel terzo esone sono responsabili degli effetti del QTL Brix9-2-5 e, quindi, della diversa attività enzimatica tra le linee isogeniche (Fridman et al., 2004). Il residuo amminoacidico acido aspartico **Asp348**, codificato all'interno di questo intervallo, risulta altamente specifico per il *S. pennellii* e altamente conservato sia tra i membri della famiglia genica (LIN6, LIN7, e LIN8) sia nelle invertasi di altre piante (Fig.26).

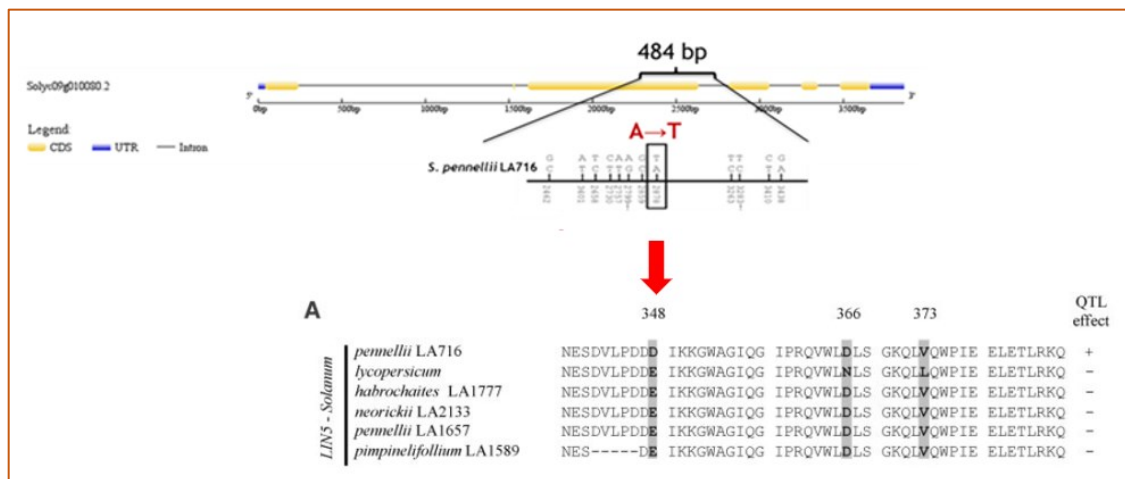
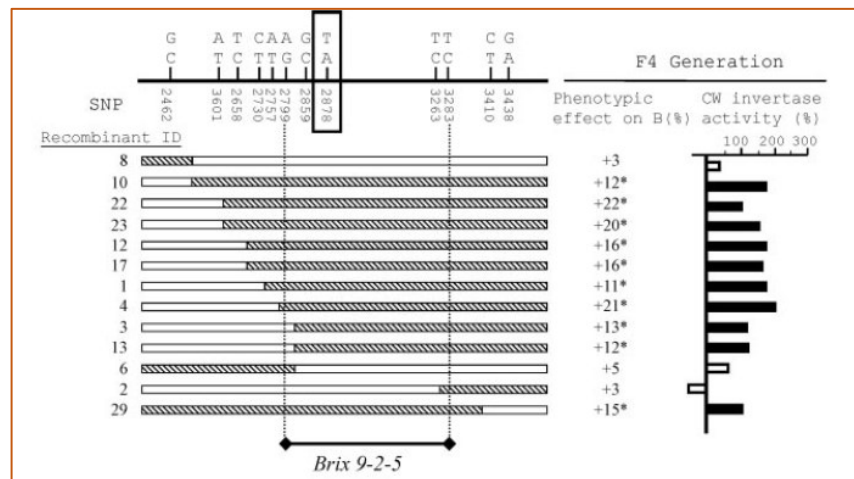


Figura 26. Gene *LIN5* di *S.pennellii* con evidenziati gli esoni (tratti gialli) e la regione di 484 bp contenente lo SNP²⁸⁷⁸ compreso nel riquadro nero che corrisponde alla modifica del residuo Asp³⁴⁸ (freccia rossa). Sono riportate le sequenze amminoacidiche delle sei specie di pomodoro studiate da Fridman et al. nel 2004.

Studi di complementazione hanno dimostrato che tale amminoacido riveste un ruolo predominante nell'aumentare l'attività dell'invertasi codificata dal gene LIN5 del *S. pennellii* e hanno individuato nella mutazione puntiforme SNP²⁸⁷⁸ il tratto quantitativo candidato che aumenta l'affinità enzimatica per il saccarosio ($K_{mSaccarosio}$) di cinque volte rispetto a quella dell'invertasi presente nel *S. lycopersicum* comportando un aumento significativo del grado Brix nel frutto (Fridman et al. 2004).

Figura 27. Localizzazione del QTL Brix9-2-5 nelle sei specie analizzate da Fridman et al. nel 2004 ed effetto della presenza del QTL sull'attività della CW invertasi. La barra bianca indica le sequenze geniche appartenenti a *S. lycopersicum*, mentre le barre tratteggiate indicano le sequenze di *S.pennellii* presenti nelle specie in esame. Si può vedere come maggiore è la presenza nel QTL delle sequenze di *S.pennellii* e maggiore è l'attività della CW invertasi.



Si nota, infine, un aumento nell'accumulo di amido in stadi precoci del metabolismo del frutto, dovuto proprio all'aumentata disponibilità di zucchero (Baxter et al. 2005).

In conclusione, la IL9-2-5 possiede un maggiore contenuto di zuccheri nei frutti a causa dell'aumentata capacità di quest'ultimi di assorbire saccarosio dal

floema e questo si è rivelato un utile strumento per indagare il meccanismo attraverso cui i cambiamenti genetici portano ad un aumento di solidi solubili.

Si ricorda, inoltre, che l'aumento del contenuto in solidi solubili è una caratteristica difficile da ottenere a causa della sua natura poligenica, ma anche per via della grande influenza dell'ambiente di crescita e delle relazioni pleiotropiche tra TSS, resa e taglia del frutto e anche dello sviluppo della chioma della pianta (Fridman et al. 2002).

1.2.3 Miglioramento genetico biotecnologico

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (FAO) ha stimato che entro il 2050 la popolazione mondiale raggiungerà i 10 miliardi di persone e ciò si traduce con un aumento nella produzione alimentare mondiale del 70% al fine di fronteggiare le conseguenti sfide alla sicurezza alimentare (FAO, 2009). Allo stesso tempo, le crescenti pressioni ambientali, costituite principalmente dall'incremento nella richiesta di terreni arabili come anche di acqua e dal declino della biodiversità, continuano a sfidare la produzione alimentare sostenibile (FAO, 2015).

Inoltre, sempre secondo i dati raccolti dalla FAO e dall'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE), le principali colture alimentari sono ancora al di sotto della loro resa potenziale in molte regioni, con divari superiori al 50% in molti paesi in via di sviluppo (FAO, 2009; OCSE, 2016).

Si è reso, dunque, necessario sviluppare nuovi approcci per lo sviluppo di colture presentanti caratteristiche di maggiore resa, qualità e resistenza alle fitopatologie.

Seppur ancora molto utilizzate, le tecniche convenzionali di breeding, o CBT, sono laboriose, presentano tempi molto lunghi, bassa efficienza e si basano ancora troppo sul lavoro manuale e ciò non è auspicabile in un contesto in cui

la richiesta di prodotto a livello mondiale, oltre ad essere alta, è anche in continua crescita.

Il trasferimento di caratteri complessi risulta essere, infatti, un processo lungo e laborioso che richiede una efficiente procedura di selezione e molte generazioni di reincrocio col parentale coltivato, al fine di recuperare la maggior parte del background genetico di quest'ultimo.

La natura poligenica di caratteri importanti quali la resa, la qualità, la tolleranza a stress biotici e abiotici, così come i problemi legati all'impiego di incroci interspecifici (incompatibilità, sterilità dell'ibrido e delle generazioni segreganti, mancanza di ricombinazione e presenza di loci indesiderati o "linkage drag") rappresentano grandi difficoltà per il raggiungimento degli obiettivi dei programmi di breeding. Molte di queste limitazioni possono essere oggi superate mediante l'impiego delle biotecnologie.

Il Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita (CNBBSV) ha adottato una classificazione che distingue le tecniche convenzionali di miglioramento genetico (Conventional Breeding Techniques - CBT) dalle *tecniche consolidate di modificazione genetica* (Established Techniques of Genetic Modification - **ETGM**) e dalle *tecniche innovative di miglioramento genetico* (New Breeding Techniques - **NBT**).

Quest'ultime, a loro volta, comprendono un'ampia varietà di tecniche che rappresentano un perfezionamento delle CBT o sono usate in combinazione con le ETGM o più spesso con le CBT.

Le NBT più innovative e promettenti sono quelle che permettono la correzione o revisione del genoma (il cosiddetto Genome Editing) per l'ottenimento di precise modificazioni della sequenza di DNA che possono variare da mutazioni puntiformi all'inserzione di geni *ex novo* (Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita, 2017).

I principali vantaggi nell'utilizzo di tecniche NBT sono la facilità e rapidità di esecuzione che si traduce in una riduzione sostanziale dei costi e nella possibilità di introdurre mutazioni differenti da quelle presenti nel pool genico della specie. Tecniche quali CRISPR/Cas permettono, infatti, di migliorare contemporaneamente tutte le copie del gene bersaglio presente all'interno del genoma in modo controllato, riducendo il co-trasferimento di tratti indesiderati durante il processo di breeding (Wang et al., 2014).

Le ETGM utilizzano acidi nucleici (DNA e RNA) ricombinanti al fine di promuovere l'inserimento stabile o transiente di una sequenza genetica in una pianta ricevente, indipendentemente dalla compatibilità sessuale con l'organismo donatore. Le piante risultanti sono riconosciute come *Piante Geneticamente Modificate* e i metodi utilizzati sono sia indiretti come la

trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, che diretti come il metodo biolistico o “gene gun” che consiste nello “sparare” un gene al fine di farlo integrare direttamente nella posizione desiderata nel genoma della cellula.

La **trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*** è una di quelle tecniche appartenenti alle ETGM che è in uso attualmente anche nelle NBT, quali Cisgenesi e Genome Editing.

Nata negli anni '70, si basa sull'espressione transiente di costrutti genetici propri del batterio aerobio gram-negativo *Agrobacterium* nei tessuti vegetali (Chilton et al., 1977).

Il metodo è stato descritto per la prima volta da Fillatti et al. nel 1987 ed è stato utilizzato proprio in pomodoro per il trasferimento del gene per la tolleranza al glifosato.

Questa tecnica sfrutta la capacità del genere *Agrobacterium* di infettare le cellule vegetali mediante utilizzo di un plasmide specifico e molto grande (200-800 Kb), il **plasmide Ti** o “***Tumor inducing***”, il cui nome deriva dalla capacità di quest'ultimo di provocare la formazione di tumori, tra cui la nota ***galla del colletto***, e la cui caratteristica principale è quella di integrare una porzione di 10-30 Kb, meglio conosciuta come **T-DNA**, all'interno del genoma della cellula infettata (Stanton B.G, 2003).

Il genere *Agrobacterium* è stato suddiviso in numerose specie sulla base dell'organismo ospite o sul tipo di patologia causata, le due specie più utilizzate sono *A.tumefaciens* e *A.rhizogenes*. Il primo possiede il **plasmide Ti** (Fig.28) che causa la galla del colletto, mentre il secondo trasporta il **plasmide Ri** che causa la crescita incontrollata di radici dal punto di infezione.

In realtà è stato visto che il tipo di patologia causata non dipende dalla specie, ma è controllata esclusivamente dal plasmide contenuto nel batterio, perciò un ceppo di *A.rhizogenes* può causare la galla del colletto se viene sostituito il plasmide Ri con il plasmide Ti, ma è stato anche accertato che se vengono rimossi del tutto i plasmidi di virulenza, i ceppi diventano non patogenici.

Per questo motivo negli ultimi anni la classificazione del genere *Agrobacterium* è stata riconsiderata in “*biovar*”, cioè si basa sulle condizioni di crescita e sulle caratteristiche metaboliche (Stanton B.G., 2003).

Andando ad analizzare più in dettaglio il meccanismo patogenetico naturale di questi batteri, esso consiste di due passaggi fondamentali: 1) *rilascio di DNA all'interno delle cellule eucariotiche* che andrà ad integrarsi nel genoma; 2) *modifica del sistema metabolico cellulare* al fine di produrre sostanze che favoriscono la crescita del patogeno (Terry A. Brown).

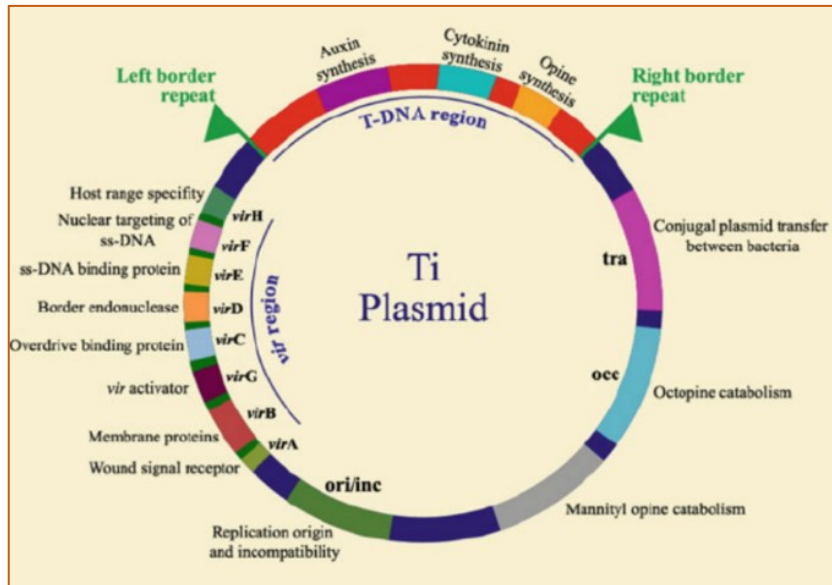


Figura 28. Schema di un plasmide Ti non ingegnerizzato di *A.tumefaciens*.

L'infezione ha inizio da lesioni tissutali superficiali della pianta che rilasciano composti fenolici rilevati dal batterio mediante una proteina, la VirA, derivante dal gene omologo e che funge da "antenna periplasmatica" in grado di far localizzare la ferita mediante *chemiotassi* (Stanton B.G., 2003, Terry A. Brown).

Inizialmente i batteri si legano alle cellule vegetali attraverso un debole legame mediato da polisaccaridi acetilati, in seguito il coinvolgimento delle fibrille di cellulosa rende il legame più forte (Terry A. Brown). Conseguentemente all'instaurarsi di questo legame, viene attivato anche il sistema *VirA/VirG*, un sistema di regolazione genetica della trasduzione dei segnali sensoriali, composto dalle due proteine VirA e VirG che permettono l'attivazione del *regulone Vir*, elemento fondamentale per l'inizio del processo di infezione in

quanto contenente più operoni coinvolti nel processo di trasferimento del DNA plasmidico extracromosomiale alla cellula parassitata.

La cascata di attivazione del sistema VirA/VirG è attivata dalla proteina **VirA** che rileva l'acidificazione del periplasma (pH 5,0-5,5), causata dai composti fenolici come anche dai monosaccaridi legati dal trasportatore **ChvE**. Bassi livelli di pH promuovono l'autofosforilazione di **VirA** che si attiva e a sua volta

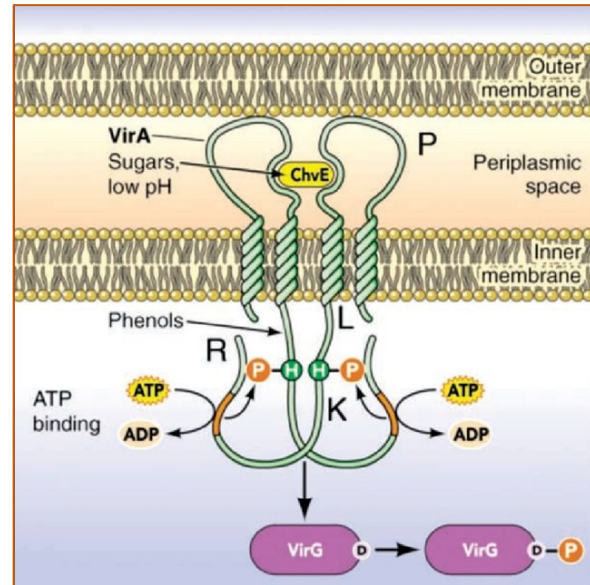


Figura 29. Sistema VirA/VirG, fondamentale per l'inizio dell'infezione, e sua attivazione promosso dall'abbassamento del pH causato dalla presenza dei composti fenolici.

fosforila **VirG**, attivandola (Fig.29) (Stanton B.G., 2003, Terry A. Brown).

Quest'ultima è una proteina citoplasmatica che, legandosi alla sequenza enhancer posta in prossimità del promotore degli operoni virA, virB, virC, virD, virE e virG, contenuti nel *regulone Vir*, ne permette la sovra-espressione. Attraverso l'azione cooperativa di **virD1** e **virD2**, viene sintetizzato il **T-strand**, cioè la porzione di DNA a singolo filamento delimitato da sequenze ripetute di 25 nucleotidi.

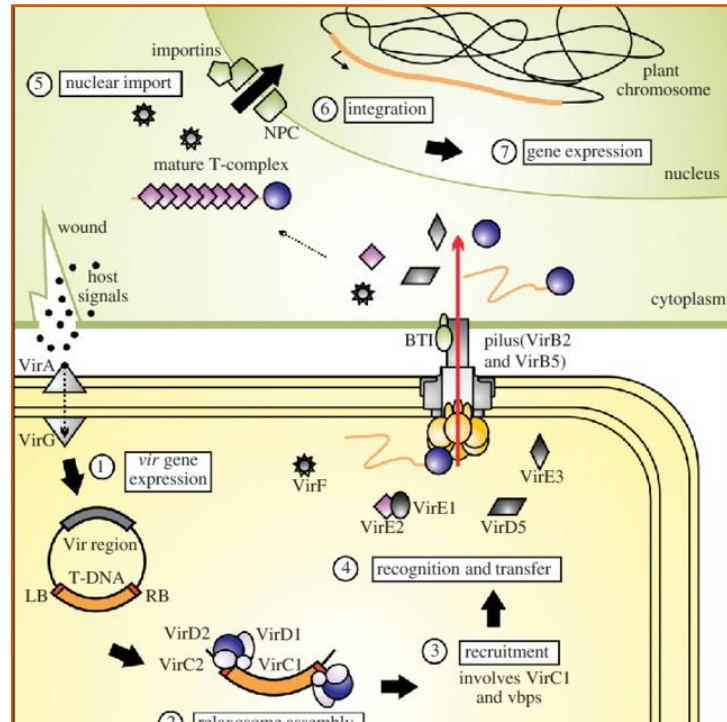
VirD2 rimane legata covalentemente alla estremità 5' del T-strand, mentre all'estremità 3' si lega la ss-DNA binding protein **VirE2**, formando così il **T-**

complex. Non è chiaro se questo passaggio avvenga nella cellula batterica o nella cellula vegetale, sicuramente è stato visto essere possibile in entrambe (Chitovsky et al., 1988).

Il T-complex viene trasportato nel citoplasma della cellula vegetale attraverso il sistema secretorio di tipo IV codificato **dall'operone VirB**, composto da 11 proteine, e da **VirD4**, che funge da linker tra VirD2 e il sistema di secrezione (Fig.30) (Stanton B.G., 2003, Terry A. Brown).

VirD2 contiene il segnale di localizzazione nucleare (NLS) che indirizza il complesso al comparto nucleare e ne permette l'entrata, inoltre sia VirE2 che VirD2 possiedono sequenze complementari al DNA genomico della pianta che vengono riconosciute da proteine endogene cellulari quali l'*importina- α* , una fosfatasi di tipo-2C, e tre *VirD2-interacting factors*, delle ciclofiline che riconoscono e legano VirD2 e due VirE2-interaction factors, VIP1 e VIP2, che legano la proteina VirE2. Tutte queste proteine hanno la funzione di trasporto nucleare e di localizzazione del sito di integrazione (Fig.30). Il T-DNA si integra mediante sistema di ricombinazione non-omologo (NHEJ).

Figura 30. Infezione delle cellule vegetali mediante trasporto all'interno del nucleo del T-DNA utilizzando il sistema di secrezione di tipo IV.



All'integrazione del T-DNA segue la formazione della galla, promossa proprio da geni presenti in questo tratto, che contengono le sequenze *cis* quali TATA-box, CAAT-box e segnali di poliadenilazione, necessari per la trascrizione delle sequenze in sistemi eucariotici.

Si hanno due classi di geni nel T-DNA: gli **oncogeni** e i **geni per la produzione di opine**, i primi alterano la sintesi dei fitormoni e la sensibilità per quest'ultimi nella cellula infetta, generando così il fenotipo tumorale, mentre i secondi risultano essere delle fonti di nutrienti necessarie per il batterio e promuovono la proliferazione tumorale.

Più in dettaglio, il T-DNA contiene cinque oncogeni che sono il gene **iaaM**, codificante per una *triptofano mono-ossigenasi* in grado di convertire il

triptofano in indole-3-acetamide, il gene **iaaH**, codificante per una *indoleacetamide idrolasi* che catalizza la sintesi del fitormone acido indolacetico (IAA) partendo dalla indol-3-acetamide, il gene **Ipt** che media la condensazione dell'adenosina monofosfato con l'isopentenil pirofosfato (iPePP) e/o un terpenoide formando l'isopentenil adenosina-5'-monofosfato (iPMP) o la zeatina riboside-5'-monofosfato (ZMP), entrambe le sostanze vengono rapidamente convertite in *trans*-zeatina da enzimi della pianta.

L'accumulazione massiccia di auxine e citochinine promuove l'attivazione degli enzimi *iaaM*, *iaaH* e *Ipt* e questo è il primo step del processo neoplastico (Escobar M.A. and Dandekar A.M., 2003).

I **geni 6b** e **5**, invece, sono oncogeni ad azione secondaria e agiscono modificando gli effetti dei fitormoni nella cellula. La funzione del prodotto del gene **6b** non è ancora chiara, ma è stato visto che altera la reattività ormonale potenziando la sensibilità alle auxine e deprimendo quella alle citochinine.

Il prodotto del gene **5**, invece, converte il triptofano nell'acido indol-3-lattico che agisce da antagonista delle auxine competendo con l'IAA nel legame delle Auxin Binding Proteins (Escobar M.A. and Dandekar A.M., 2003).

La seconda classe di geni contenuta nel T-DNA sintetizza sostanze a basso peso molecolare derivate da amminoacidi o zuccheri fosfati chiamate *opine*.

Sono state individuate più di venti differenti tipi di opine nella galla del colletto e nelle hairy roots, ma solo un piccolo numero di questi può essere contenuto nel T-DNA di ciascun ceppo batterico, inoltre queste sostanze si possono classificare in tre sottotipi: **nopaline**, **octopine** e **agropine**.

Le prime due sono solitamente ammine secondarie ottenute dalla condensazione di un amminoacido con un chetoacido o con uno zucchero, mentre le seconde sono gluco-fosfodiesteri. È stato stimato che circa il 7% del peso secco del tessuto tumorale sia composto da opine che compongono il substrato di crescita per l'Agrobatterio e ne promuovono la coniugazione e la chemiotassi (Escobar M.A. and Dandekar A.M., 2003). A seguito della scoperta e comprensione di questo sistema di infezione, si è pensato di sfruttarlo al fine di promuovere l'integrazione di geni esogeni all'interno di vari tipi di cellule vegetali, ottenendo così piante geneticamente modificate.

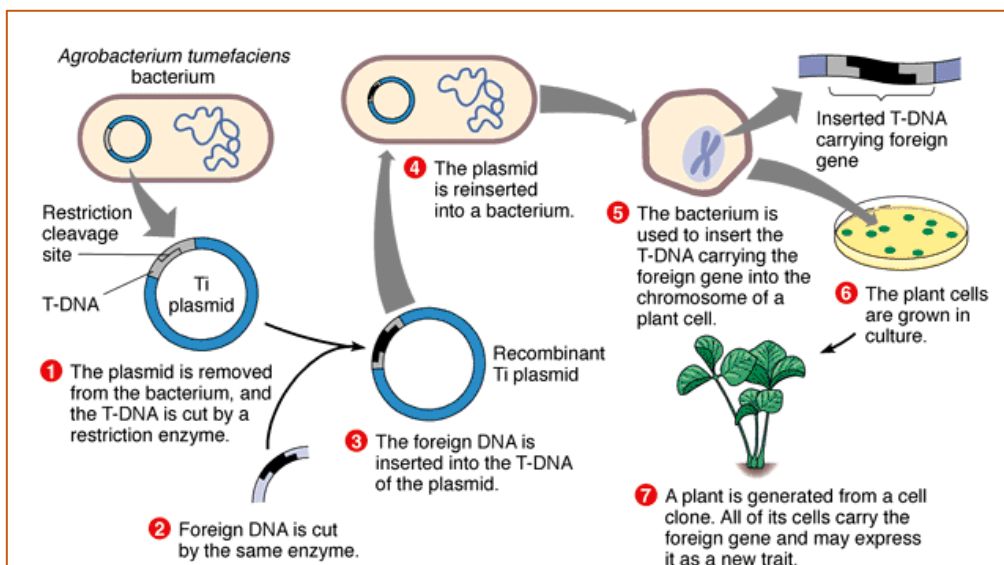


Figura 31. Schema del sistema di trasformazione mediata da *A.tumefaciens*.

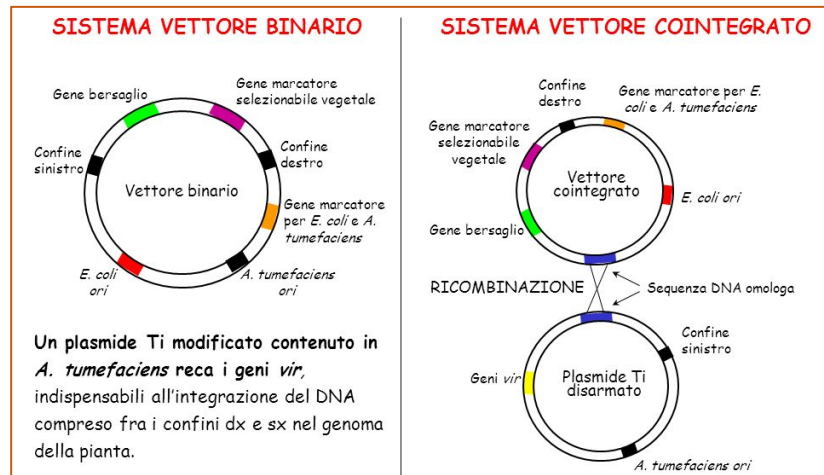
Uno dei primi problemi riscontrati è stato quello di individuare siti unici di restrizione in plasmidi di così grandi dimensioni, quali i plasmidi Ti e Ri, e per ovviare a questo problema sono stati messi a punto due sistemi: il **sistema del vettore binario** e il **sistema della cointegrazione** (Fig.32).

Il primo si basa sulla non necessità di avere il T-DNA fisicamente in continuità con il resto del plasmide Ti, infatti è risultato possibile trasformare efficientemente le cellule vegetali attraverso un sistema basato su due plasmidi, di cui quello di piccole dimensioni contiene il T-DNA e possiede un sito unico di restrizione, risultando così semplice da manipolare con tecniche standard, mentre l'altro di dimensioni maggiori contiene i geni fondamentali per l'infezione. Di fatto alcuni ceppi di *A.tumefaciens*, come anche altri agrobatteri simili, posseggono naturalmente questi sistemi di plasmidi binari.

Il secondo utilizza un plasmide interamente nuovo, derivato da un vettore di *E.coli* che porta una piccola porzione del T-DNA. L'omologia tra la nuova molecola e il plasmide Ti fa sì che, quando entrambi presenti nella stessa cellula di *A.tumefaciens*, un evento di ricombinazione integri il plasmide di *E.coli* all'interno del segmento di T-DNA. In questo modo, dunque, risulta possibile inserire il gene di interesse all'interno del sito unico di restrizione presente sul piccolo plasmide di *E.coli* e il costrutto ottenuto viene inserito nei ceppi di *A.tumefaciens* contenenti il plasmide Ti al fine di permettere che il processo

naturale di ricombinazione integri il nuovo gene all'interno della sequenza del T-DNA. L'infezione della pianta con il batterio ricombinante porta all'inserzione del nuovo gene, assieme al resto del T-DNA, nel cromosoma vegetale (Terry A. Brown).

Figura 32. I due sistemi di maggiore utilizzo per la trasformazione genetica mediata da Agrobacterium che si basano su plasmidi ingegnerizzati.



Attualmente il metodo standard per il trasferimento del T-DNA di *Agrobacterium* è il sistema del vettore binario e i ceppi di *Agrobacterium* più comunemente utilizzati sono *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* che vengono trasformati mediante elettroporazione con i plasmidi, Ti (“Tumor-inducing”) o Ri (“Root-inducing”) rispettivamente, **disarmati**, cioè privi degli oncogeni, che causerebbero la trasformazione delle cellule vegetali in cellule tumorali, come anche dei geni che promuovono la sintesi di auxine e citochinine, poiché questi ormoni impediscono i normali processi di **rigenerazione tissutale** (Simpson R.B., 1986).

Per il processo di trasformazione, i geni rimossi dal T-DNA vengono sostituiti con i geni di interesse, ma anche con marker di selezione, quali, ad esempio, i geni di resistenza a determinati tipi di antibiotici.

Agrobacterium viene, dunque, messo in condizioni di infettare porzioni di tessuto vegetale ricavate solitamente dai cotiledoni, ma anche dalle foglie vere o dalla parte assile dell'embrione posta al di sotto dei cotiledoni, l'*ipocotile*, o, più raramente, direttamente le piante, operando dei tagli, dunque delle ferite.

I tessuti prelevati si definiscono *espianti* e la tecnica utilizzata è la *coltura in vitro*, che si basa sul fenomeno della *totipotenza* delle cellule vegetali, ovvero la capacità che ha una singola cellula o gruppi di cellule vegetali di rigenerare un'intera pianta. La totipotenza è un'attitudine propria delle cellule somatiche vegetali grazie alla quale, superato il periodo di differenziamento, queste sono in grado di riacquistare la capacità di dividersi, dando luogo alla formazione di nuovi tessuti. Nelle cellule vegetali, infatti, a differenza di quelle animali, la separazione tra la linea somatica e la linea germinale è molto tardiva, e presentano, inoltre, anche un accrescimento numerico illimitato.

Queste peculiari caratteristiche del mondo vegetale fanno sì che le cellule somatiche siano in grado di riacquistare le caratteristiche giovanili e la capacità di dividersi, dando luogo alla formazione di nuovi tessuti.

Nelle biotecnologie vegetali questa caratteristica è ampiamente sfruttata per dare origine a germogli geneticamente modificati (McCormick S., 1986).

La trasformazione mediata da *Agrobacterium* prevede una prima fase definita di “**pre-condizionamento**”, che permette di raggiungere una più alta resa del processo infettivo e che consiste in un’incubazione di 48 ore delle porzioni cotiledonari, poste con la faccia adassiale su di un substrato nutritivo a composizione nota, in fotoperiodo e con gli opportuni ormoni.

Al termine di questa fase, si procede con l’infezione degli espianti mediante sospensione batterica a cui segue un periodo definito “**co-coltivazione**” nel quale le porzioni tissutali vengono poste su terreno opportuno per 48 ore al buio (McCormick S., 1986).

È necessario, poi, trasferire gli espianti su terreni con le specifiche sostanze di selezione al fine di permettere la sopravvivenza dei soli tessuti contenenti, grazie all’infezione, il costrutto portante il gene per la resistenza e che si integrerà nel genoma cellulare, causando la *callogenesi*, cioè la formazione di una massa disorganizzata di grandi cellule a pareti sottili e contenenti un grosso vacuolo che presentano caratteri di elementi parenchimatici, definita **callo**.

Nella coltura in vitro i processi che si osservano sono l’**organogenesi** e l’**embriogenesi somatica**.

Il primo è un processo che può considerarsi unico delle piante e consiste nella produzione di strutture unipolari, quali le radici o i germogli, a partire da aggregati cellulari o tessuti vegetali non meristemati, attraverso la formazione di centri meristemati avventizi, detti meristemoidi (Thorpe, 1978; 1982).

Il processo organogenetico, oltre ad essere in relazione con la specie e il genotipo usato, è anche controllato dalla composizione del terreno di coltura così come da fattori fisici ed ambientali. È stato, infatti, dimostrato che i regolatori di crescita sono fondamentali in questo processo e il rapporto tra auxine e citochinine assume un ruolo chiave nell'organogenesi.

A tal proposito è stato osservato che mezzi di coltura presentanti rapporti auxine/citochinine elevati inducono la *rizogenesi*, dunque la formazione di radici, quelli con rapporti auxine/citochinine bassi, invece, inducono la *caulogenesi*, cioè la formazione di germogli, mentre quando i livelli di auxine e citochinine si equivalgono nel mezzo di coltura viene promossa la formazione di callo, la *callogenesi* (Skoog and Miller, 1957).

Il secondo, l'embriogenesi somatica, si basa sulla formazione di strutture morfologicamente e fisiologicamente simili a quelle degli embrioni zigotici da parte di singole cellule di qualsiasi organo vegetale e porta, dunque, alla formazione di individui completi per mezzo di embrioni somatici. Questi presentano una struttura bipolare, con un meristema apicale ed uno radicale in

grado di svilupparsi in una pianta completa di radici, fusto, foglie e fiori attraverso stadi ontogenetici del tutto simili a quelli che caratterizzano la germinazione e lo sviluppo degli embrioni zigotici (George E.F., 1996).

Entrambi questi fenomeni, l'organogenesi e l'embriogenesi somatica in vitro, possono avvenire per via diretta, cioè a partire da cellule somatiche dell'espanto iniziale, oppure per via indiretta, cioè a partire da cellule indifferenziate del callo intermedio.

Il metodo che si è scelto di utilizzare nella ricerca in esame è il processo morfogenetico indiretto poiché permette una più alta percentuale di moltiplicazione, anche se ciò implica un maggiore rischio di alterazioni genetiche, e i tessuti di elezione per la coltura in vitro di pomodoro, sono i cotiledoni e gli ipocotili.

Il vantaggio di utilizzare la trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens* in combinazione con la coltura in vitro è quello di ottenere un numero significativo di germogli geneticamente trasformati.

I piccoli germogli derivanti dai calli devono essere rimossi dal tessuto iniziale e vengono posti su substrati contenenti gli ormoni in grado di promuovere la **radicazione**.

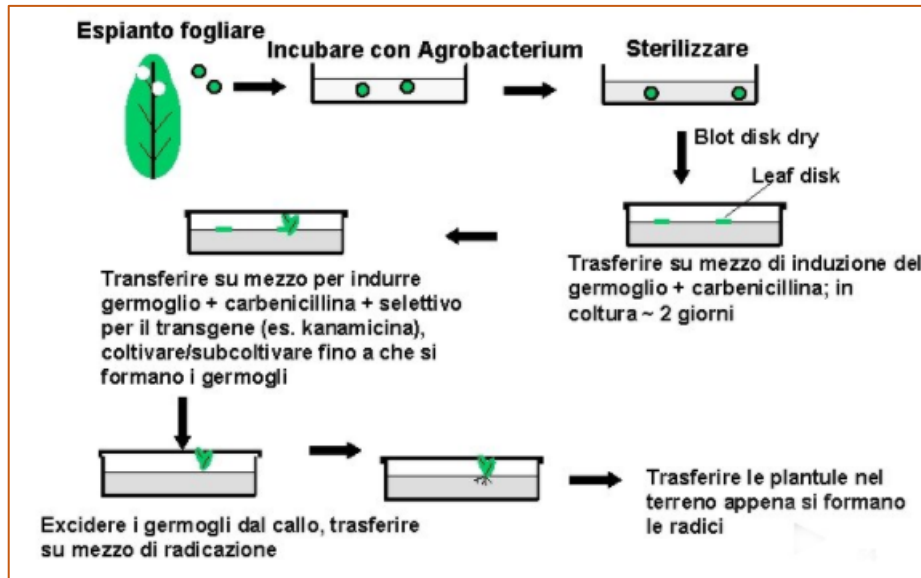


Figura 33. I diversi step che costituiscono la tecnica dell'Agroinfiltrazione.

È importante ricordare che esistono tre tecniche di trasformazione mediata da *Agrobacterium*: la prima è l'agroinfiltrazione in "*sensu stricto*", basata sull'utilizzo di tessuti non germinali, per lo più foglie, che vengono infiltrati con una sospensione liquida di *Agrobacterium* che trasporta un gene di interesse (Fig.33), la seconda tecnica prevede l'agroinfezione di tessuti non germinali, tipicamente le foglie, infiltrati con un **vettore virale** contenente un gene di interesse e mediante il quale l'espressione del gene di interesse si diffonde nell'intera pianta, mentre la terza e ultima tecnica prevede l'immersione di **tessuti germinali**, tipicamente fiori, in una sospensione di *Agrobacterium* al fine di ottenere una trasformazione stabile e gli embrioni ottenuti vengono selezionati allo stato di germinazione (Lusser M., 2012).

Nella ricerca di interesse sono stati utilizzati i primi due metodi, cioè l'agroinfiltrazione in sensu stricto per la tecnica della Cisgenesi, mentre l'agroinfiltrazione con vettore virale per il Genome Editing.

La tecnica dell'agroinfiltrazione viene utilizzata anche per lo screening di piante con fenotipi utili da poter introdurre nei programmi di miglioramento genetico, come anche per la produzione di proteine ricombinanti ad alto valore nutritivo, sebbene queste applicazioni rimangano circoscritte nel contesto di ricerca e comprensione di aspetti quali l'interazione pianta-patogeno nei tessuti o per testare la funzionalità degli elementi regolatori nei costrutti genici (Lusser M., 2012).

1.3 Nuove tecniche di miglioramento genetico in pomodoro

Lo sviluppo delle nuove tecniche di miglioramento genetico trova le basi nel continuo progresso nella comprensione dei processi biologici vegetali e della diversità genetica offrendo, dunque, nuove opportunità per lo sviluppo di varietà vegetali che risultano più adatte ad affrontare le sfide dell'agricoltura moderna.

Attraverso il “Next-generation DNA sequencing”, cioè il sequenziamento del DNA di nuova generazione, e lo sviluppo di sistemi di analisi e di sistemi quali l’*High-throughput genome assembly*, avanza sempre più la comprensione della complessità dei genomi vegetali, mentre la proteomica, la trascrittomica e la metabolomica migliorano le conoscenze sulle funzioni cellulari (Fig.34).

Le ***New Breeding Techniques*** (NBT) offrono la possibilità di apportare modifiche genetiche in modo molto più preciso di quanto fosse possibile in precedenza, attraverso il riconoscimento di siti specifici localizzati nel genoma. Questi nuovi strumenti risultano essenziali per rendere massimo il potenziale delle colture e per cercare di superare l’ostacolo della limitata diversità genetica al fine di ottenere miglioramenti in caratteristiche importanti come la resistenza ai parassiti, l'uso efficiente di acqua e azoto, la tolleranza alla siccità e il miglioramento del contenuto nutrizionale e del gusto (Seyran E., Craig W., 2018).

Le NBT hanno la capacità di introdurre nuovi prodotti sul mercato impiegando tempi e costi inferiori rispetto a tutte le altre tecniche, soprattutto delle CBT, e, inoltre, sono in grado di ridurre il numero di tratti indesiderati che potrebbero essere co-trasferiti durante il processo di breeding e che, normalmente, vengono rimossi in fasi successive (Schaart & Visser, 2009).

L'enorme potenziale delle NBT risiede, perciò, nella loro relativa facilità di utilizzo come anche nella precisione, velocità e basso costo delle metodiche, consentendo in questo modo di fronteggiare più rapidamente le esigenze dei coltivatori e dei consumatori che risultano sempre più variabili.

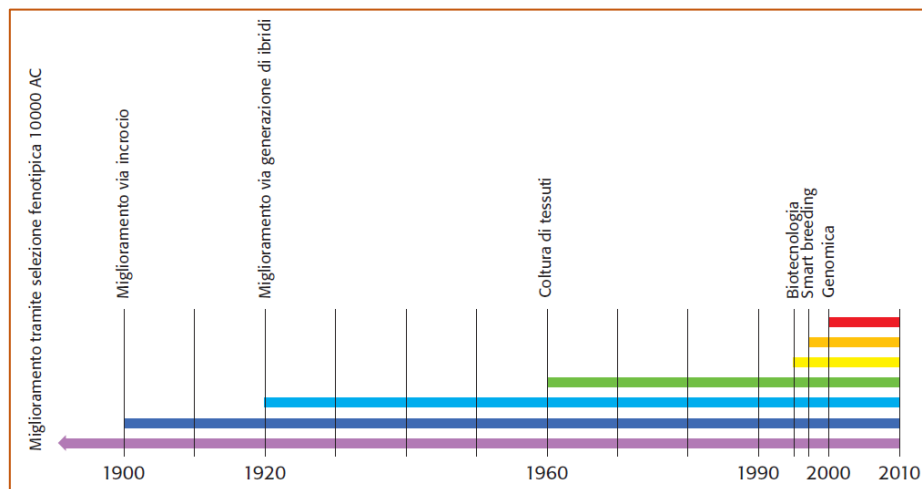


Figura 34. Varie tecniche di miglioramento genetico utilizzate in differenti periodi storici.

Con l'obiettivo di soddisfare le richieste della popolazione e allo stesso tempo di garantire una produzione efficiente ed ecologicamente sostenibile, negli ultimi anni sono state sviluppate nuove biotecnologie e tra queste le più

promettenti appaiono il breeding basato sulla *cisgenesi* e l'*editing genomico* (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

Entrambe queste tecniche necessitano di metodi di trasferimento di DNA ed il più utilizzato per le dicotiledoni, come il pomodoro, è il trasferimento mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, mentre per le monocotiledoni e le specie che presentano una bassa suscettibilità all'infezione da parte di questo agrobatterio, il trasferimento di DNA prevede l'uso di un acceleratore di particelle, il *particle gun* (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

1.3.1 Cisgenesi

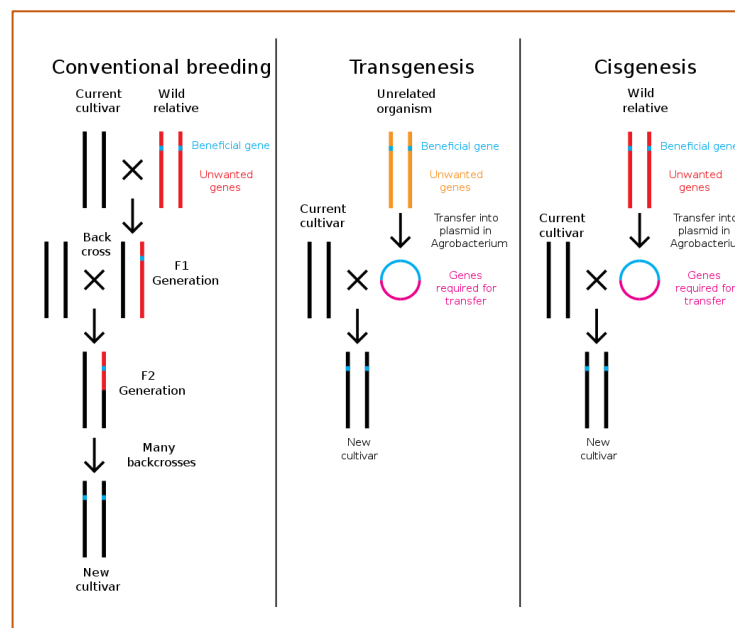
Per *cisgenesi*, termine coniato da Schouten, Krens e Jacobsen nel 2006, si intende il trasferimento di uno o più *cisgeni*, ovvero geni nativi, con le proprie sequenze regolatrici, e nel normale orientamento, tra organismi appartenenti alla stessa specie o anche a specie diverse, ma affini e sessualmente compatibili. Per giunta, la sequenza codificante del gene trasferito contiene i propri introni e la sua espressione è sotto il controllo del proprio promotore e terminatore, se ne deduce, dunque, che il prerequisito fondamentale di questa tecnica è l'isolamento e la caratterizzazione dei geni di interesse dalla stessa specie o da specie affini.

La quantità sempre crescente di informazioni sulle sequenze del DNA dei singoli geni come anche sui genomi delle varie specie vegetali, combinata alla sempre maggiore conoscenza delle funzioni geniche, ha consentito una ricerca diretta di alleli utili sia nelle specie coltivate che nelle specie selvatiche imparentate.

Uno dei grandi potenziali della cisgenesi è quello di riuscire a superare l'effetto a collo di bottiglia che si presenta sempre più spesso nelle specie coltivate e ottenute con le CBT (Schouten H.J. et al., 2006).

Questa tecnica non può essere considerata una novità nell'ambito della tecnologia del DNA ricombinante, poiché deriva dalla *transgenesi*, che si basa sul trasferimento di uno o più geni esogeni provenienti da specie diverse o anche da un regno diverso. Perciò, mentre nelle tradizionali piante GM il gene inserito può essere prelevato da qualunque essere vivente (batterici, animali, specie vegetali diverse), nelle piante cisgeniche il gene deriva da una pianta affine alla specie coltivata nella quale, almeno in linea teorica, potrebbe essere introdotto anche attraverso una serie ripetuta di incroci (Cattivelli, 2015).

Figura 35. Differenza tra le tecniche convenzionali di breeding, la transgenesi e la cisgenesi.



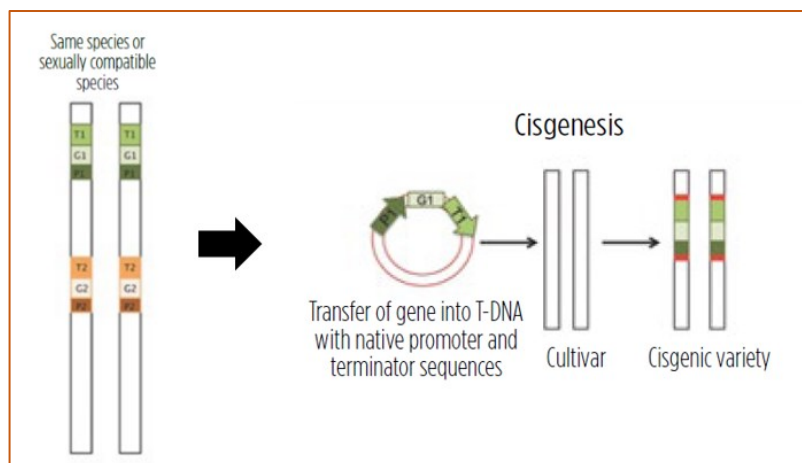
La cisgenesi, dunque, è una tecnica sviluppata proprio a seguito delle preoccupazioni dell'opinione pubblica riguardanti la sicurezza delle colture transgeniche, che presentano diversi rischi, molto spesso imprevedibili, come

l'accumulo di alcune sostanze da cui scaturiscono fenomeni di tossicità, allergie e minacce genetiche per l'uomo e non solo.

Le piante cisgeniche sono considerate più sicure, non solo delle piante transgeniche, ma anche rispetto a quelle ottenute con i tradizionali metodi di breeding poiché il rischio di introdurre di geni indesiderati è praticamente nullo, come anche molto bassi sono i rischi della traslocazione indotta o della mutazione genetica. Diversamente dalle piante ottenute da breeding convenzionale, infatti, una pianta cisgenica contiene esclusivamente il gene o i geni di interesse del donatore e nessun altro elemento genetico indesiderato.

È importante enfatizzare che con la cisgenesi, la sequenza genica che si trasferisce nel genoma ricevente resta invariata, il gene è perfettamente identico a quello presente nella specie donatrice, e la regione codificante contiene sia gli esoni che gli introni, oltre alle sequenze regolatrici originali (promotore e terminatore), disposti secondo il loro normale senso di orientamento (Fig.36) (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

Figura 36. Nella tecnica della Cisgenesi il gene di interesse utilizzato appartiene alla stessa specie o a specie sessualmente compatibili e viene inserito con il suo promotore e terminatore secondo il loro naturale senso di orientamento.



Oltre alla già menzionata nulla probabilità di introdurre geni indesiderati, spesso impossibile da evitare nei metodi convenzionali di breeding, a causa dell'alto tasso di eterozigosi di molte colture, si mantiene perciò anche l'intero genoma intatto. Anche questo aspetto è impossibile da ottenere con i classici metodi di incrocio poiché si sa che l'incrocio tra due individui porta ad un rimescolamento genico generale.

La cisgenesi, dunque, è una tecnologia concettualmente innovativa poiché offre la possibilità di massimizzare la similitudine del risultato ottenibile con il trasferimento genico convenzionale mediato da incrocio, inoltre, in virtù di questa peculiarità, non è considerata potenzialmente rischiosa per l'ambiente e la salute.

Con questa tecnica, perciò, si riesce a produrre un organismo simile a quello che si ottiene con l'incrocio, avendo però il vantaggio di consentire una riduzione dei tempi necessari per giungere alla varietà ed evitando il trasferimento indesiderato di sequenze associate al gene di interesse che spesso risultano avere un effetto negativo sul fenotipo (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

1.3.2 Genome editing

Il *Genome editing* o “editing del genoma” è l’insieme delle tecniche in grado di correggere, rimuovere, inserire o sostituire specifiche sequenze di DNA in un punto preciso del genoma (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

Con queste strategie è possibile introdurre mutazioni mirate in siti specifici del genoma avvalendosi di endonucleasi capaci di introdurre un nick, cioè un taglio a doppia elica nel DNA, a cui segue l’azione di riparazione dei meccanismi cellulari endogeni quali il *Non-homologous end joining* (NHEJ) e l’*Homology-directed repair* (HDR), con il vantaggio di poter modificare una sequenza di DNA senza spostarla dalla sua posizione naturale nel genoma (Belhaj *et al.*, 2015).

La NHEJ crea piccole inserzioni/delezioni (indels) nei siti di rottura del DNA, causando la perdita (silenziamento genico) o la modifica della funzione del gene e portando, dunque, alla formazione di un fenotipo mutato; il meccanismo di riparazione HDR, invece, si basa sull’impiego di una sequenza di DNA “donatore”, il **Donor**, che risulta omologa al sito bersaglio di taglio e che permette l’inserimento o sostituzione del gene target (Fig.37) (Puchta and Fauser, 2014; Rinaldo and Ayliffe, 2015).

Le endonucleasi, definite anche “*forbici molecolari*”, sono in grado, dunque, di introdurre tagli in una specifica sequenza del DNA a cui segue l’inserimento,

la delezione o la sostituzione di porzioni di oligonucleotidi, come anche di singoli nucleotidi, con tratti di acido deossiribonucleico contenenti la modifica desiderata.

Negli ultimi due decenni, sono stati individuati quattro diversi tipi di endonucleasi, ognuna delle quali possiede una particolare struttura in grado di scindere una specifica sequenza di DNA: 1) *Meganucleasi*; 2) *Zinc-finger nucleasi (ZFNs)*; 3) *Transcription activator like effector nucleases (TALEN)*; 4) *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas9)* (Barcaccia & Lucchin, 2016).

Alla base della capacità di tutti i sistemi di manipolazione del genoma di introdurre i cambiamenti in una specifica sequenza si ha la funzione di “selettore molecolare”, associata alle endonucleasi, mentre per quanto riguarda la riparazione del taglio, questa viene affidata ai sistemi cellulari di riparazione del DNA e può portare, a seconda degli obiettivi e, quindi, della strategia adottata, all’introduzione di piccole mutazioni o alla sostituzione di una precisa sequenza con una sequenza differente scelta dall’operatore (Federazione Italiana Scienze della Vita).

Fino a qualche anno fa, gli strumenti principali di modifica del genoma erano le nucleasi ZFN e le TALEN, solo di recente il sistema CRISPR/Cas9 è risultato essere il sistema più efficace per l’editing genomico, grazie alla sua semplice

struttura e alla facile applicabilità ad una vasta gamma di organismi (Barcaccia G, Lucchin M., 2016).

Denominato ufficialmente **Crispr/Cas9**, questo sistema è stato riconosciuto dall'Accademia di Stoccolma come rivoluzionario poiché, modificando con estrema precisione il DNA di piante, animali e microrganismi, “ha avuto un impatto relevantissimo sulle scienze della vita, sta contribuendo a nuove terapie contro il cancro e può realizzare il sogno di curare le malattie ereditarie”.

CRISPR o “**Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats**, come rinominato da Mojica et al. nel 2002, consiste in *brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate ad intervalli regolari*, presenti in più del 40% dei genomi batterici e nel 90% degli Archea sequenziati fino a quel momento e associati ad essi si hanno clusters denominati **Cas**, cioè “**signature CRISPR-associated**”, che sono sequenze adiacenti agli elementi ripetuti CRISPR ma che, al contrario di quest’ultime che risultano estremamente variabili, sono molto conservate.

Nel 2005 Mojica *et al.*; Pourcel *et al.*; Bolotin *et al.* scoprono che le *sequenze spacer*, cioè quelle sequenze non ripetute presenti tra le ripetizioni palindrome, hanno origine fagica e ciò permise di comprendere che effettivamente il sistema CRISPR-Cas9 nient’altro è che il sistema immunitario dei microrganismi

basato su acidi nucleici e con il quale i batteri si difendono dall'infezione da parte di virus (Barrangou et al., 2007).

Grazie a queste ricerche è stato, inoltre, accertato che esistono differenti tipi di sistemi CRISPR/Cas9 che sono stati suddivisi in due gruppi sulla base della struttura dell'endonucleasi Cas: la **classe 1**, che comprende i **tipi I, III e IV**, nella quale il modulo Cas è costituito da un complesso multiproteico, e la **classe 2**, che comprende i **tipi II, V e VI**, nella quale è presente una sola proteina Cas (Hille e Charpentier, 2016).

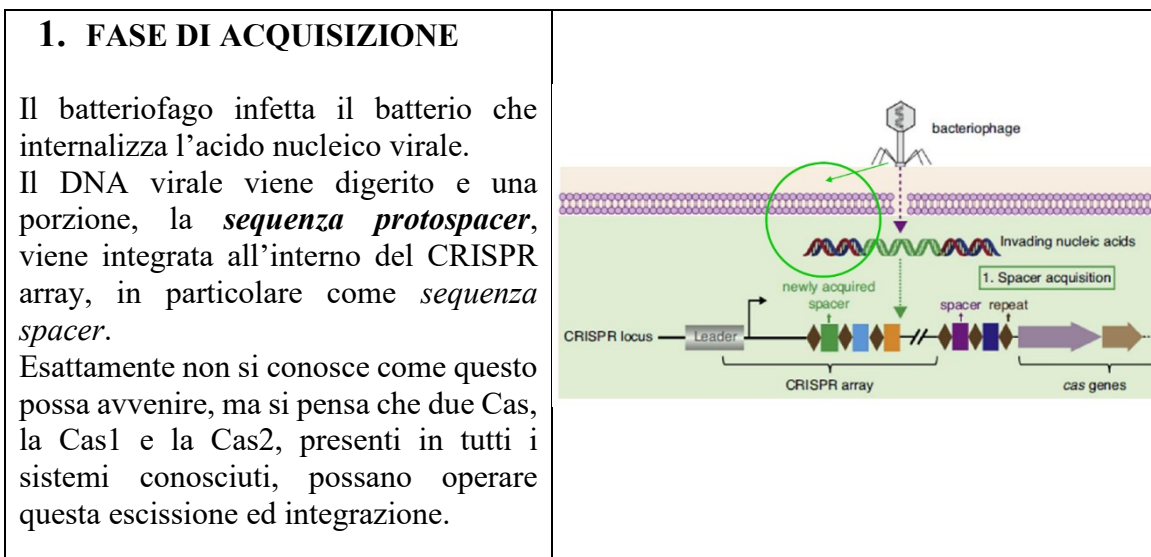
Il sistema più utilizzato attualmente è il sistema di tipo II, basato sull'azione endonucleasica di Cas9, che introduce un taglio all'interno della doppia elica del DNA sequenza specifico grazie alla sua capacità di riconoscere il sito target attraverso l'associazione con delle corte sequenze di RNA di circa 20 bp, le *single guide RNA* o **sgRNA**, che sono sequenze spacers non ripetute e in grado di appaiarsi al DNA target. Esse, dunque, *guidano* l'enzima in posizioni genomiche specifiche e, nelle applicazioni di ingegneria genetica, la sequenza sgRNA da associare a Cas9, viene scelta in maniera tale da guidare l'enzima nel punto esatto dove si vuole effettuare l'editing genomico.

Di fondamentale importanza sono anche le sequenze **PAM** ("*Protospacer Adjacent Motif*"), la cui sequenza consenso, NGG, è adiacente al 3' terminale

delle 20 bp del target (Jinek *et al.*, 2012) e che hanno la funzione di “ancoraggio” dell’enzima al DNA, definendo i limiti di una data sequenza.

Mentre l’attività dell’enzima è sufficiente per introdurre in una posizione specifica mutazioni casuali, quando l’obiettivo è l’inserimento di una mutazione mirata, alle cellule devono essere fornite sequenze esogene di DNA, i **Donor**, che devono avere alta identità di sequenza con il sito target e devono contenere le modifiche da introdurre.

Sfruttando il sistema naturale di riparazione del DNA per Ricombinazione omologa sarà, dunque, la cellula stessa a provvedere alla riparazione del danno a doppio filamento, utilizzando proprio il DNA Donor esogeno fornito e completando così l’editing (Fig.38) (Terry A. Brown). Il sistema naturale di difesa contro le infezioni consta di tre fasi:



<p>2. FASE DI ESPRESSIONE</p> <p>Vengono trascritti sia i geni della Cas che quelli del locus CRISPR. Quest'ultimo viene prima trascritto in un lungo precursore, il <i>pre-crRNA</i>, che viene poi processato in <i>crRNA</i>.</p> <p>La maturazione del pre-crRNA coinvolge un piccolo tratto di RNA, il <i>trans-activating RNA</i> o <i>tracrRNA</i>, che si trova a monte dell'operone Cas (geni Cas9, Cas1, Cas2, Csn2) e si lega alle sequenze ripetute del pre-crRNA, guidando l'RNasi III dell'ospite nel taglio.</p>	<p>2. CRISPR-Cas express</p>
<p>3. FASE DI INTERFERENZA</p> <p>Il crRNA maturo si assembla con un insieme di proteine Cas nei sistemi di tipo I e III oppure con la singola endonucleasi Cas9 nel sistema di tipo II, e guida il complesso proteico sul tratto di DNA virale complementare, causandone il taglio.</p> <p>Le sequenze PAM sono fondamentali per la promozione della degradazione del DNA esogeno ed è stato visto che una loro mancanza causa tagli anche verso le sequenze self, mentre una loro mutazione causa un non riconoscimento della sequenza target e permette, dunque, ai fagi di sfuggire all'attacco del sistema immunitario batterico (Terry A. Brown).</p>	<p>3. CRISPR interfere by crRNA-guided surveillance</p>

L'utilizzo dell'editing nel miglioramento genetico è attualmente limitato da due principali ordini di considerazioni.

Il primo è rappresentato dal fatto che è necessario conoscere i geni che devono essere oggetto della modificazione e, quindi, è importante individuare i geni

che controllano le caratteristiche agronomiche che si vogliono migliorare per poterle modificare in maniera precisa (Federazione Italiana Scienze della Vita).

Il secondo riguarda il fatto che i sistemi vegetali utilizzano maggiormente il sistema di ricombinazione non omologo (NHEJ) per la riparazione del DNA, che aumenta la probabilità di introdurre indels o di causare knockout genico, a differenza del sistema di ricombinazione omologa che, utilizzando il braccio omologo come stampo, opera una riparazione precisa del taglio (Gorbunova and Levy, 1999).

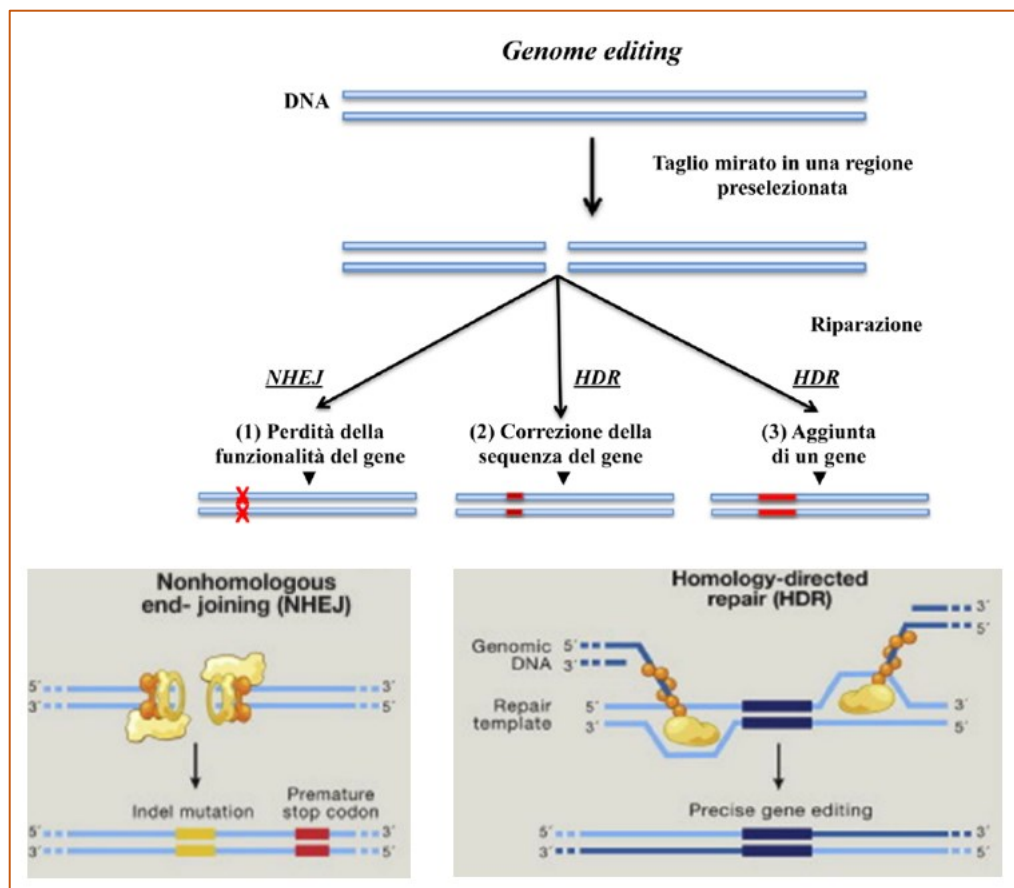


Figura 37. Differenza tra la riparazione del DSB mediante il sistema NHEJ e l'HDR. Le piante utilizzano maggiormente il primo per una questione di vantaggio evolutivo.

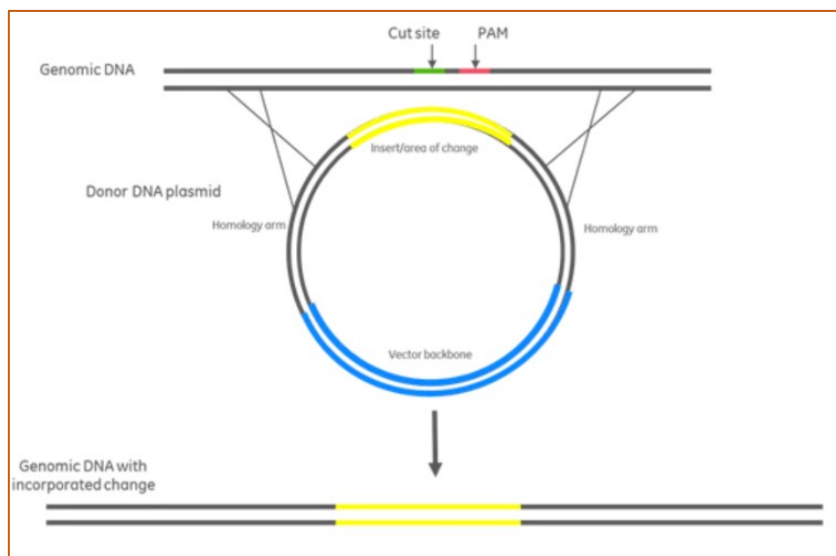


Figura 38. Sistema di riparazione del danno a doppio filamento, causato dalla Cas9, mediante HDR. Nei vettori vengono inserite anche sequenze apposite, le sequenze Donor, che hanno alti livelli di omologia con la sequenza target, ma contengono anche le modifiche che si intendono introdurre nella cellula.

Avendo la necessità di introdurre una modifica specifica in una posizione esatta nel genoma della pianta di interesse e possedendo la sequenza del DNA Donor, sono stati sviluppati **vettori basati su virus** ingegnerizzati (Shen e Hohn, 1994) e in grado di replicare numerose copie del DNA mediante il *sistema a cerchio rotante* (*Rolling Circle Replication*, RCR) e, quindi, di aumentare le probabilità che il DSB venga riparato via Ricombinazione omologa con conseguente aumento dell'efficienza del sistema (T.Dahan-Meir et al. 2018).

I virus di elezione sono i virus a RNA per le monocotiledoni, mentre per le dicotiledoni si preferisce utilizzare virus a DNA ed anche a ssDNA, come i Geminivirus.

Per la ricerca in esame è stato utilizzato il **Virus del fagiolo giallo nano** o BeYDV (“Bean Yellow Dwarf virus”), un Geminivirus (Fig.39) molto

utilizzato in pomodoro e i cui geni fondamentali per la replicazione all'interno della cellula ospite sono stati inseriti nel T-DNA del plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*.

I **Geminivirus** appartengono alla famiglia Geminiviridae, la famiglia più ampia dei virus di classe II, che si suddivide in 9 generi e 485 specie che sono diffuse in tutto il mondo.

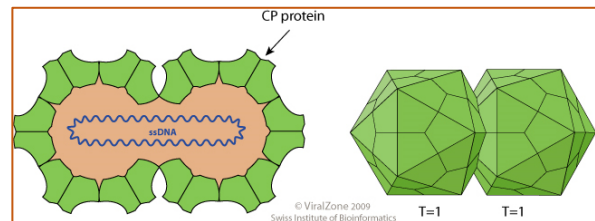


Figura 39. Aspetto del capsid dei Geminivirus che ha la peculiare forma “a due icosaedri incompleti” e contiene un filamento di ssDNA.

Le caratteristiche principali di questi virus, che li rendono eccezionali per l'applicazione del Genome editing, sono: 1) la capacità di infettare un'ampia gamma di specie di piante ospiti appartenenti a famiglie differenti, tra cui grano, mais, cotone, pomodoro, cucurbitacee, fagioli, legumi, frutta, piante ornamentali ed erbacee comuni, 2) il fatto che richiedono un'unica proteina, la proteina Rep, per avviare la replicazione all'interno della cellula ospite, 3) sono in grado di riportare la cellula ospite alla fase S nella quale viene utilizzata maggiormente la Ricombinazione omologa e 4) sono in grado di replicare efficientemente all'interno della cellula ospite producendo una grande quantità di copie che aumentano la probabilità di sostituzione della sequenza target presente nel genoma (Zaidi and Mansoor, 2017).

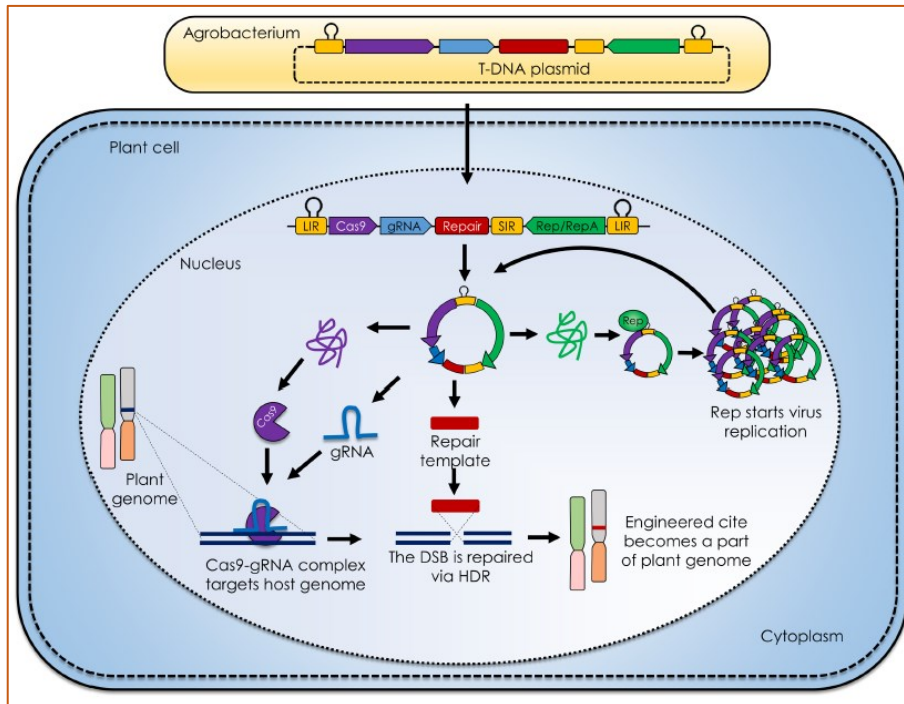


Figura 40. Schema riassuntivo della trasformazione genetica mediata dal plasmide *Ti* ingegnerizzato a base virale.

Il plasmide viene trasmesso alla cellula infettata direttamente dall'*Agrobacterium* ma, una volta che il T-DNA viene introdotto all'interno del nucleo, questo ha delle caratteristiche di replicazione virale grazie ai geni inseriti all'interno del T-DNA.

Come riportato in Fig.40, il plasmide *Ti* di *Agrobacterium tumefaciens* contiene un T-DNA che porta i geni fondamentali per la replicazione del virus BeYDV, oltre che il DNA Donor, che sono il gene codificante la proteina **Rep**, che permette l'inizio della replicazione e che può essere espresso utilizzando sia il promotore costitutivo che differenti promotori inducibili, la proteina **RepA**, che interagisce con una proteina che controlla la progressione del ciclo cellulare verso la fase S, ideale per la replicazione del DNA virale e le regioni **LIR** (“**L**ong **i**ntergenic **r**egion”) e **SIR** (“**S**hort **i**ntergenic **r**egion”), unici elementi cis richiesti per la RCR (Liu *et al.*, 1999).

Più in dettaglio, la sequenza LIR contiene un promotore bidirezionale e una struttura a stelo che è essenziale per l'inizio della Replicazione a cerchio rotante, mentre la sequenza SIR è l'origine della sintesi del filamento C e contiene segnali di terminazione della trascrizione e di poliadenilazione (T.Dahan-Meir et al. 2018).

Normalmente il virus presenta tra le regioni intergeniche LIR e SIR i geni della proteina del movimento (MP) e della proteina del capsido (CP), posti sul filamento senso (V) (Fig.41), ma nelle applicazioni di ingegneria genetica questi geni vengono rimossi in quanto non considerate utili (Zaidi and Mansoor, 2017),

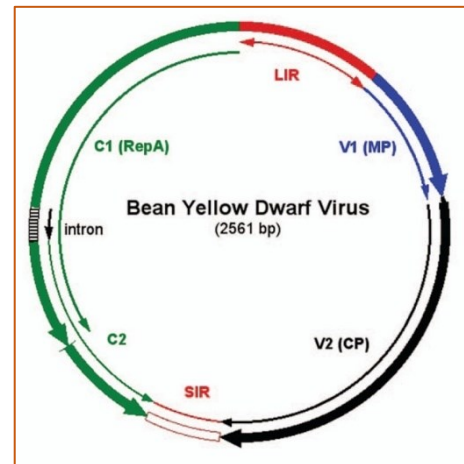


Figura 41. Genoma del Virus del fagiolo giallo nano.

mentre il gene per la proteina Rep, sebbene sia necessario per la replicazione, può essere anche fornito in trans, perciò non è necessario che sia presente nel replicone virale (T.Dahan-Meir et al. 2018).

Dopo aver infettato la cellula vegetale con un plasmide Ti così modificato, il T-DNA di quest'ultimo viene rilasciato all'interno del citoplasma e viene in seguito portato al compartimento nucleare.

Qui l'ssDNA viene convertito nella forma replicativa dsDNA, che viene trascritta in mRNA, in particolare, vengono trascritte per prime le sequenze

della Cas9 e del sgRNA che si associano a formare un complesso che si porta sulla sequenza target, lega le sequenze PAM e introducono un DSB. In caso di riparazione del danno mediante Ricombinazione omologa, il DSB viene riparato utilizzando la sequenza di DNA Donor contenuta nel T-DNA (Fig.40). Contemporaneamente alla trascrizione del T-DNA, la proteina Rep riconosce una sequenza interna al LIR e genera un nick in un filamento dal quale può partire la RCR, mentre la proteina RepA prodotta interagisce con proteine cellulari specifiche e spinge la cellula ad entrare in fase S, nella quale viene duplicato il DNA, oltre a numerose proteine. Un aspetto molto importante è che il replicone a base virale, seppur in grado di replicarsi mediante RCR, non è infettivo e permette di trasferire anche grandi sequenze di DNA (Dahan-Meir *et al.*, 2018).

Si può comprendere, perciò, come nel Genome editing si utilizzino sempre più vettori a base virale poiché coniugano la replicazione autonoma con la capacità di apportare modifiche specifiche nel genoma target degli organismi di interesse.

Seppur molto dibattuti e controversi gli utilizzi di questa innovativa tecnica, la scoperta di questo sistema, del tutto naturale, è valsa il premio Nobel per la Chimica 2020 a due ricercatrici, la biochimica statunitense Jennifer Doudna,

dell'Università della California di Berkeley, e la microbiologa francese Emmanuelle Charpentier (www.lescienze.it).

Sebbene per anni ci sia stata una grande incertezza normativa da parte dell'Unione Europea riguardante i prodotti ottenuti mediante Genome Editing, il 29 aprile 2021 la Commissione Europea ha pubblicato uno studio che ha confermato il potenziale dei prodotti NGT nel contribuire ai sistemi agroalimentari sostenibili in linea con gli obiettivi del Green Deal europeo e della strategia Farm to Fork ed ha altresì affermato che qualsiasi ulteriore azione politica dovrebbe mirare a consentire i prodotti NGT al fine di contribuire la sostenibilità.

Le applicazioni NGT nel settore agricolo non devono, comunque, compromettere altri aspetti della produzione alimentare sostenibile, come l'agricoltura biologica (www.ec.europa.eu).

La Commissione Europea ha, inoltre, riconosciuto la flessibilità, la convenienza e la facilità d'uso degli NGT, in particolare quelli basati su sistema CRISPR-Cas ed ha constatato come l'utilizzo di queste tecniche sia sempre più frequente, affermando che “il sistema CRISPR sta aprendo le porte a diverse possibili novità in termini di organismi bersaglio”.

A breve termine, dunque, entreranno in fase pre-commerciale circa 30 applicazioni in impianti, animali e microrganismi e questi potrebbero

raggiungere il mercato nei prossimi 5 anni, mentre a medio termine, oltre 100 piante, diverse decine di animali e applicazioni medicinali che sono ora nella fase avanzata di ricerca e sviluppo potrebbero raggiungere il mercato entro il 2030 (European Commission, 2021).

2. SCOPO DELLA TESI

Il pomodoro è una delle colture orticole più diffuse e produttive del mondo ed è proprio per questo motivo che è diventato uno degli ortaggi più importanti nel panorama delle colture mondiali al giorno d'oggi.

L'Italia è uno dei paesi maggiori produttori, sia per consumo fresco che per i prodotti trasformati.

Per poter incrementare ulteriormente sia la produzione che la qualità del prodotto è fondamentale valorizzare tutti i diversi comparti della filiera del pomodoro, a partire dalla realizzazione di diversi obiettivi di miglioramento genetico. Questi possono essere realizzati con successo grazie anche all'ausilio di una vasta ricchezza di risorse genetiche oggi disponibili per il pomodoro (Monti L., Barone A., 2010).

La necessità di ottenere frutti di maggiore qualità implica il raggiungimento di qualità organolettiche e nutrizionali ben precise nelle bacche, che devono essere definite da parametri fisico-chimici determinati al fine di rendere più appetibile il prodotto al consumatore.

Tra i parametri valutati, il contenuto di *solidi solubili totali* (TSS) in pomodoro è risultato molto importante ed ha ricevuto delle attenzioni e delle pressioni maggiori a qualsiasi altro tipo di coltura.

Il progetto BIOTECH, sottoprogetto CISGET, ha proprio come fine quello di costituire varietà di pomodoro con un elevato grado Brix mediante l'impiego delle New Breeding Techniques quali la Cisgenesi e il Gene editing.

Lo scopo della tesi associata al progetto BIOTECH è quello di inserire la mutazione puntiforme SNP²⁸⁷⁸ del gene Lin5 del *S. pennellii* (Fig.42) nel pomodoro. Questa singola mutazione puntiforme causa la sostituzione di una adenina con una timina e ciò si traduce con una sostituzione di un residuo di acido glutammico con uno di *acido aspartico* (**Asp³⁴⁸**) che si trova nella posizione 348 della sequenza amminoacidica.

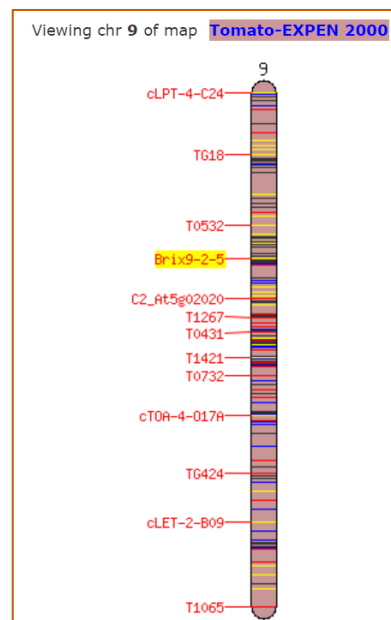


Figura 42. Posizione del QTL Brix9-2-5 all'interno del cromosoma 9 del pomodoro (www.solgenomics.net).

Tutto questo discorso si converte in aumento del grado Brix poiché proprio il residuo amminoacidico 348, localizzato nel sito catalitico dell'enzima invertasi, comporta l'aumento dell'affinità dell'invertasi per il saccarosio, nel momento in cui viene sostituito l'amminoacido acido, il glutammato, con l'acido aspartico. La mutazione che si vuole introdurre risulta, perciò, una mutazione sinonima.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

Per la messa a punto del protocollo di rigenerazione sono stati utilizzati 26 genotipi di pomodoro (Tab.), da mensa e da industria, di cui 4 varietà commerciali e 22 accessioni costituite presso la sede di Monsampolo del Tronto e afferenti alle tipologie Cuore di Bue, Pera D'Abruzzo e San Marzano.

MATERIALE VEGETALE		
N°	Accessioni	Tipologia
1	San Marzano 622	Mensa
2	M3	Mensa
3	Cuor di Bue 1	Mensa
4	Cuor di Bue 2	Mensa
5	Cuor di Bue 3R	Mensa
6	Cuor di Bue 4R	Mensa
7	Cuor di Bue 5R	Mensa
8	Cuor di Bue 6R	Mensa
9	Cuor di Bue 7	Mensa
10	Allungato	Mensa
11	Cilieginò	Mensa
12	Pera d'Abruzzo	Mensa
13	Pera d'Abruzzo	Mensa
14	PR	Mensa
15	LA4104	Mensa
16	L276	Mensa
17	PARMA MEC	Ind. Concentrati
18	OVAL RED	Ind. Concentrati
19	ARIZONA	Ind. Concentrati
20	RED PEEL	Ind. Pelati
21	VF65	Ind. Pelati
22	CASTELLONG	Ind. Pelati
23	UC 82	Var. commerciale
24	Microtom	Var. commerciale
25	Money maker	Var. commerciale
26	Ailsa Craig	Var. commerciale

Tabella 7. Elenco delle accessioni utilizzate per le prove di rigenerazione e riferimento alla tipologia a cui appartengono.

Le accessioni locali sono state scelte in quanto espressione del territorio e della tipicità italiana, e quindi, di fondamentale importanza sia per il miglioramento genetico sia per la valorizzazione del germoplasma di pomodoro. Tra i genotipi utilizzati, 7 sono risultati più rispondenti: 5 da mensa e 2 da industria.

Tra questi sono stati scelti 3 genotipi da utilizzare nei processi di trasformazione genetica: Ailsa Craig, Pera d'Abruzzo e la L276.

3.2 Prove di rigenerazione

Da plantule di circa 10 giorni delle cultivar riportate in tabella 7 e cresciute sul substrato di coltura MS base (4,4 g/L MS + saccarosio 10 g/L + agar 0,8%, pH 5,7 KOH) in contenitori Magenta sterili, sono stati prelevati i cotiledoni che sono stati tagliati in due parti, dopo aver eliminato le porzioni apicale e basale, per la trasformazione ad espianto cotiledonare.

Negli esperimenti di trasformazione, gli espianti vengono posti con la pagina abassiale rivolta verso l'alto in capsule Petri contenenti 25 mL di terreno P3 o E2 (Tab.8) in camera di crescita in fotoperiodo e a temperatura costante di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Dopo 48 ore, i cotiledoni preconditionati sono stati infettati con l'inoculo di *A. tumefaciens* per 20 minuti e poi collocati nuovamente sullo stesso terreno al buio, in camera di crescita a temperatura di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. Al termine del periodo di co-coltivazione, gli espianti sono stati trasferiti sul substrato di rigenerazione che consiste sempre nel terreno P3 o E2 (Tab.8) addizionato con Cefotaxime e Kanamicina e mantenuti in fotoperiodo in luce Cool-white fluorescent x Gro-Lux light $60\text{--}100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ per una settimana. Sono stati testati, dunque, due terreni differenti per l'induzione della formazione dei calli prima e dei germogli poi.

Il trasferimento in terreno fresco è stato eseguito circa ogni 20 giorni e gli espianti che hanno mostrato la crescita del callo prima, e di un germoglio di lunghezza di circa 1 cm poi, sono stati prelevati sotto cappa a flusso laminare con pinze sterili e i germogli sono stati rimossi dal resto del tessuto cotiledonare mediante bisturi sterile e sono stati posti all'interno di provette sterili con differenti terreni di radicazione: P5, E3 e P9 (Tab.9). Le condizioni di crescita dei germogli sono le stesse utilizzate per l'induzione della formazione dei germogli.

I tre terreni di radicazione differiscono per il contenuto di saccarosio decrescente (tab.9), ma anche per il contenuto auxinico, in particolare di IAA, del quale si hanno concentrazioni differenti: 0,1 mg/L per il substrato E3, mentre nei substrati P5 e P9 non è presente questa auxina.

Sono state testate, dunque, diverse varianti del protocollo di rigenerazione del pomodoro al fine di identificare quale fosse il più efficiente e per individuare la cultivar con il maggior tasso di rigenerazione. Per l'inoculo sono stati utilizzati due ceppi di *A.tumefaciens*, LBA4404 ed AGL1.

Induzione germogli	Sali	Saccarosio (g/L)	Vitamine	Agar (%)	pH	Ormoni
P3	MS	30	MS	0,7	5,8	1 mg/L Zeatina + 0,1 mg/L IAA Ficcadenti et al., 1999
E2	MS	30	MS	0,8	5,9	4 mg/L IAA e Kinetina + 1 mg/L Zeatina Ellul et al., 2003

*Tabella 8. Terreni utilizzati per l'induzione della formazione di calli prima e di piccoli germogli poi dagli espianti infettati con *A.tumefaciens*.*

Terreno di radicazione	Sali	Saccarosio (g/L)	Vitamine	Agar (%)	pH	Ormoni
P5	MS	30	Nitsch	0,7	5,8	0,05 mg/L Acido folico Chetty et al., 2003
E3	MS	20	MS	0,8	5,8	0,1 mg/L IAA Ellul et al., 2003
P9	MS	15	MS	0,7	5,8	Sun et al., 2006

Tabella 9. Elenco dei terreni di radicazione e della relativa composizione utilizzati per la definizione del protocollo di rigenerazione.

3.3 Trasformazione di *Escherichia coli* e *Agrobacterium tumefaciens*

Per il clonaggio dei costrutti coinvolti nelle tecniche di Cisgenesi e Gene editing è stato utilizzato il ceppo JM109 di *E.coli* (Promega). Queste cellule sono state già rese competenti dall'azienda produttrice e la trasformazione è stata condotta mediante la tecnica dell'Heat Shock.

La sospensione cellulare (50 µL), mantenuta a – 80°C, è stata lasciata incubare con la sospensione plasmidica (30 ng, 2-5 µL) per circa 30 minuti in ghiaccio. Segue lo shock termico a 42°C per 45 secondi e le sospensioni così trattate vengono poste in ghiaccio per 2 minuti. Al termine dell'incubazione viene aggiunto 1 mL di LB liquido e la sospensione batterica viene messa ad incubare per un'ora a 37°C, 150 rpm,

Al termine dell'incubazione, i batteri vengono piastrati su terreno LB agarizzato (Tab.10) e incubate overnight a 37°C.

Composizione	pH	Test bianco-blu	Antibiotici
10g/L Bactotriptide 5 g/L Yeast Extract 5 g/L NaCl 12 g/L Agar	7,5 NaOH	IPTG (0,5mM) + X-gal (80 mg/ml)	Ampicillina (100 mg/mL) o Kanamicina (100 mg/mL)

Tabella 10. Composizione del terreno LB solido utilizzato per la crescita del ceppo JM109 di E.coli (Promega).

La trasformazione dei due ceppi scelti, AGL1 e LBA4404, di *A. tumefaciens* è stata condotta mediante la tecnica dell'elettroporazione, perciò è stato necessario rendere prima le cellule *elettrocompetenti* attraverso diversi passaggi in soluzione fredda di glicerolo.

La *preparazione dei ceppi di Agrobacterium elettrocompetenti* è avvenuta mediante un protocollo ben preciso che consta di cinque lavaggi in glicerolo.

Aliquote di batteri conservate a -80°C sono state prelevate mediante scarificazione con puntale sterile e sono state risospese in terreno LB liquido con gli antibiotici opportuni (Tab.11) e sono state incubate per 2 giorni (LBA4404) o 3 giorni (AGL1) a 28°C , 200 rpm.

Verificato il raggiungimento della fase logaritmica, corrispondente ad un valore spettrofotometrico di OD_{600} tra 0,6-1, al fine di ottenere un'efficienza maggiore di trasformazione, si è proceduto con l'incubazione per 15 minuti della sospensione batterica in ghiaccio, a cui segue la centrifugazione a 4000 rpm per altri 15 minuti. Si prosegue poi con una serie di cinque lavaggi in glicerolo 10% a concentrazioni 1X, 0,5X, 0,02X (ripetuto due volte) e 0,01X rispettivamente. La concentrazione 1X di glicerolo corrisponde al volume tal quale, dunque ai 50 mL di sospensione batterica iniziali sono stati aggiunti 50 mL di glicerolo 10%. Ad ogni lavaggio si centrifuga a 4000 rpm a 4°C e si elimina il surnatante. A questo punto si può procedere con l'elettroporazione mediante

elettroporatore MicroPulser della BIO-RAD ed è stato utilizzato il programma pre-settato per *Agrobacterium* (2,2 kV, 6,20 sec).

Sono state anche effettuate prove con cuvette aventi gap differenti, una da 0,2 cm e una da 0,1 cm. Il *gap* è la distanza tra i due elettrodi ed è importante al fine di trasmettere una corretta intensità di campo alla sospensione cellulare. Si è fatta anche attenzione nel porre la guida dell'elettroporatore in freezer o in ghiaccio dieci minuti prima del processo per non interrompere la catena del freddo.

Dopo la scarica si aggiunge subito 1 mL di terreno liquido, LB per il ceppo AGL1 e TY per LBA4404 (Tab.11), all'interno della cuvetta da cui, poi, viene prelevato attraverso una pipetta Pasteur sterile fornita direttamente con le cuvette. Segue incubazione per 2 ore a 28°C a 200 rpm al termine della quale 100 µL di sospensione batterica vengono piastrati su terreno LB agarizzato contenente gli antibiotici Kanamicina (50 µg/mL) e Rifampicina (50 µg/mL).

Sono stati piastrati anche 100 µL di sospensione batterica concentrata operando una centrifugazione gentile a 6000 rpm per un minuto, a cui segue la rimozione di parte del surnatante, di cui vengono lasciati 100 µL con i quali il pellet viene risospeso. Le piastre vengono lasciate incubare a 28°C per due giorni.

Terreno per <i>A.tumefaciens</i>					
<i>Ceppo</i>	<i>Terreno</i>	<i>Composizione</i>	<i>pH</i>	<i>Antibiotici per crescita</i>	<i>Antibiotici per selezione</i>
AGL1	<u>LB</u> liquido	Bactotriptone 1% Bactoyeast 0,5% NaCl 1%	7,5 NaOH	Rifampicina (10 µg/mL) + Carbenicillina (100 µg /mL)	Rifampicina (100 µg/mL) + Kanamicina (100 µg /mL)
LBA4404	<u>TY</u>	Triptone 5 g/L Yeast extract 3 g/L CaCl ₂ 6 H ₂ O 1,325 g/L	7 KOH	Rifampicina (10 µg/mL) + Streptomicina (100 µg /mL)	

Tabella 11. Composizione del terreno di crescita dei ceppi di *A.tumefaciens* utilizzati e relativi antibiotici utilizzati rispettivamente per la crescita e per la selezione dopo trasformazione per elettroporazione.

CISGENESI

3.4 Schema sperimentale

Il disegno sperimentale utilizzato per la tecnica della Cisgenesi è basato sulla co-trasformazione mediante il vettore binario pGreen – pSoup (Hellens et al., 2000; Vain et al., 2003; Afolabi et al., 2005).

Si è scelto di preparare costrutti di grandezze differenti, ma che si basano tutti sulla sequenza del *S. pennelli* depositata nel National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con l'identificativo NC_028645.1:3588788-3593616, dopo analisi di sequenza effettuata mediante il PyroMarkQ24 (Qiagen) condotto con primers specifici disegnati utilizzando il software dello strumento (Pyrosequencing Assay Design) per una regione di 78 bp contenente lo SNP²⁸⁷⁸.

In particolare, sono stati progettati tre costrutti di grandezze differenti, tutti aventi la sequenza di 4820 bp che corrisponde al terzo esone del gene LIN5 di *S.pennellii* con lo SNP di interesse, e sono: il **2UP**, di 7329 bp, contenente l'esone del LIN5, 2000 bp a monte del promotore nativo del gene e 500 bp a valle del terminatore nativo del gene, il **4UP** di 9829 bp contenente il terzo esone del gene LIN5, 4000 bp a monte del promotore nativo del gene e 1000 bp a valle del terminatore nativo, mentre il terzo costrutto è stato denominato

gene only in quanto contiene il solo esone di LIN5, dunque la sequenza di 4820 bp.

È stato necessario inserire all'interno del vettore pGreen II i tre frammenti sopra descritti, tutti di grandi dimensioni, dunque si è deciso di utilizzare a tale scopo un kit apposito, il kit *In-Fusion® HD Cloning* (Takara Bio USA).

Il *sistema binario di trasferimento del DNA pGreen-pSoup* si basa sull'utilizzo del vettore binario **pGreenII** (Fig.43), di 3304 bp e in grado di replicare in *Escherichia coli* grazie all'origine di replicazione ColE1, ma non in grado di replicare in *Agrobacterium tumefaciens* se non in presenza di un plasmide helper, il **pSoup** (Fig.44), presente già all'interno del batterio.

Quest'ultimo provvede alle funzioni di replicazione in trans per pGreenII, in particolare trasporta il gene *TrfA* che codifica per la *Plasmid replication initiator protein TrfA*, una proteina necessaria alla replicazione del plasmide pGreen del quale riconosce l'OriV e ne permette la replicazione insieme alla DnaA della cellula ospite.

Esso, inoltre, ha dimensioni maggiori, 9275 bp, in quanto contiene i geni fondamentali per la replicazione a cerchio rotante (RCR) quali la *TrfA* sopra menzionata, *RepA*, una DNA elicasi omoesamerica formata da 279 residui amminoacidici e che ha la funzione di riconoscere l'origine di replicazione del pGreenII al fine di iniziare la RCR, il marcatore di selezione TetR, codificante

per la resistenza all'antibiotico Tetraciclina, che agisce unitamente alla proteina codificata dal gene TcR, la *Tetracycline efflux protein*.

Il pGreenII, dunque, risulta incapace di replicare senza il pSoup e possiede solo il marcatore di selezione KanR, codificante per un'amminoglicoside fosfotrasferasi, in grado di rendere resistente il ceppo alla *Kanamicina* e il gene LacZ α che viene utilizzato per lo screening bianco-blu.

Questo costrutto possiede, però, differenti siti di restrizione per la linearizzazione e l'inserzione della sequenza di interesse e per questo esperimento si è scelto di utilizzare le endonucleasi **ACC65I** e **XmaI** che generano tagli sfalsati (Fig.45).

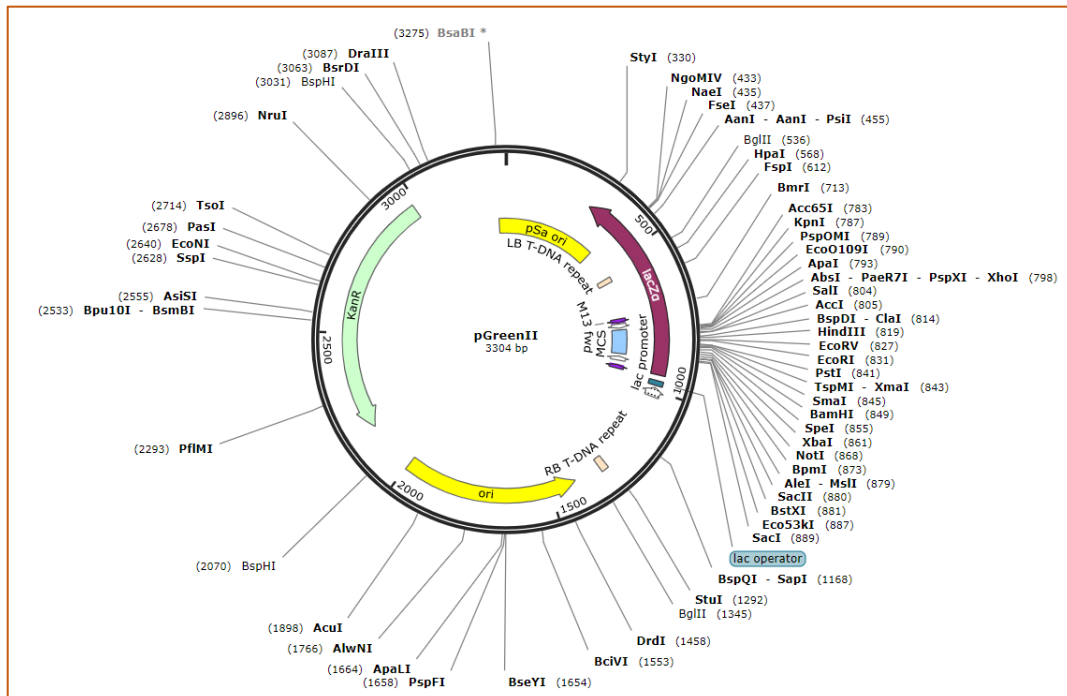


Figura 43. Plasmide pGreenII all'interno del quale sono stati inseriti i frammenti 2UP, 4UP e la sola sequenza per l'esone 3 di LINS. Questo vettore possiede la resistenza per l'antibiotico Kanamicina e il gene LacZ α per il test bianco-blu, ma non è in grado di replicare all'interno di *Agrobacterium* senza il plasmide helper.

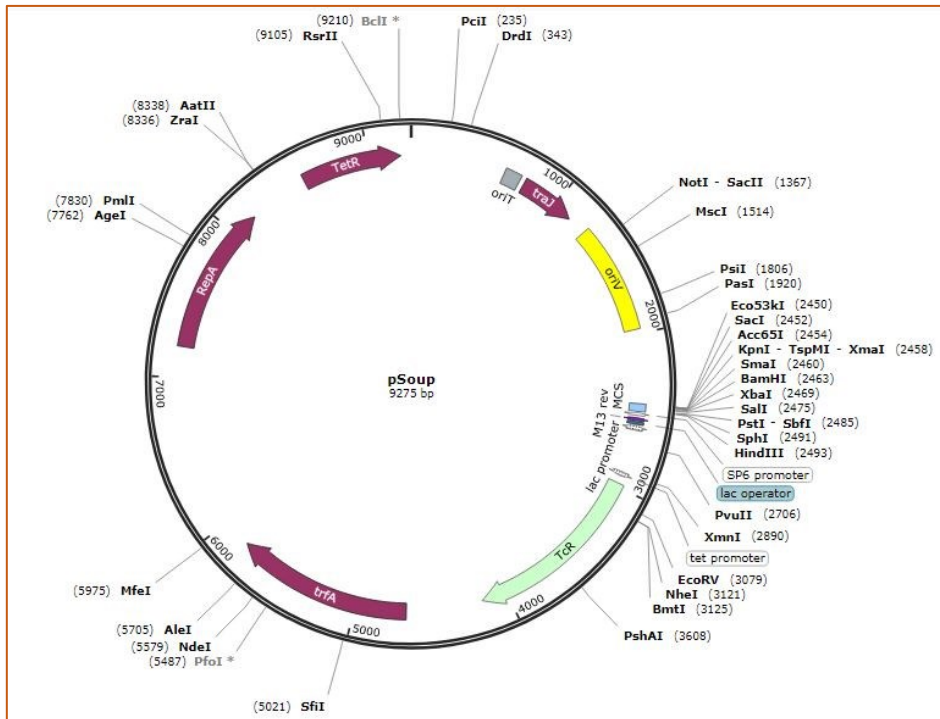


Figura 44. Plasmide helper pSoup che fornisce gli elementi fondamentali per la replicazione del pGreenII, in particolare RepA.



Figura 45. Siti di restrizione scelti per l'inserzione delle sequenze all'interno dei vettori pGreenII e pGreen0029.

Le dimensioni contenute del pGreenII, unitamente all'alto numero di copie ottenibili in *E.coli*, offrono una maggiore efficienza nelle procedure di ricombinazione in vitro, inoltre si ha l'inserzione del solo gene di interesse senza la presenza di marker specifici, necessariamente da eliminare in secondo tempo, e questo è permesso proprio dal fatto che questo vettore non riesce a replicare senza il plasmide helper.

Come controllo nella trasformazione genetica è stato utilizzato il pGreen0029 (Fig.46) che contiene il gene NptII per la resistenza alla Kanamicina e nessun frammento inserito.

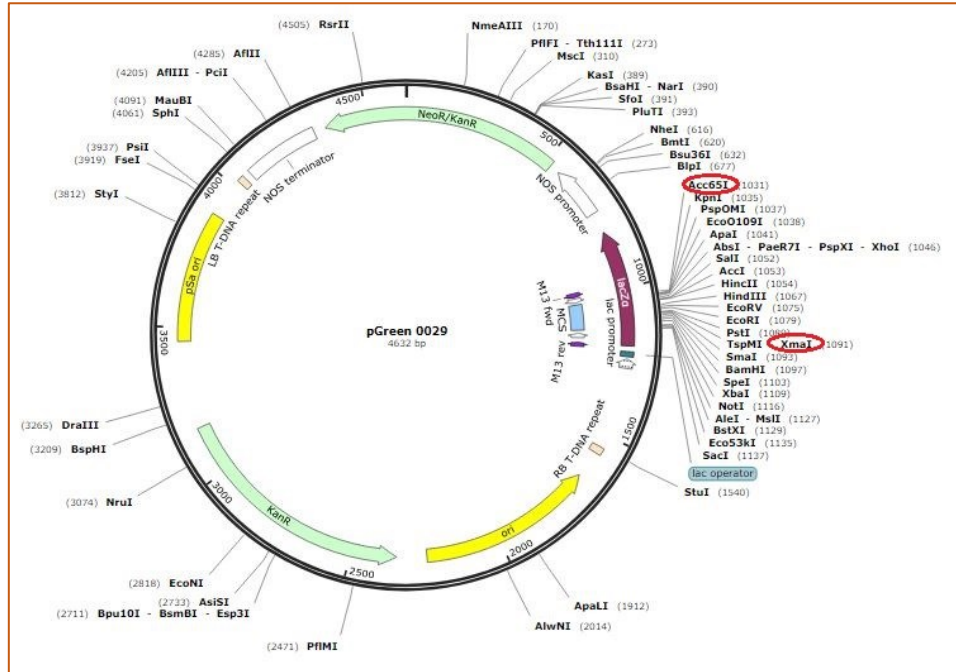


Figura 46. Plasmide pGreen0029, utilizzato per questo esperimento come controllo. Possiede i geni per la selezione KanR, che rende il ceppo resistente alla Kanamicina e NeoR/KanR che rende il ceppo resistente anche alla Gentamicina (G418) e alla Neomicina. È presente anche il gene LacZa per lo screening bianco-blu.

3.5 Preparazione dei costrutti

Il primo passaggio per la preparazione dei costrutti è il clonaggio delle tre sequenze 2UP, 4UP e il Gene Only.

Si è cercato inizialmente di ottenere il clonaggio dei frammenti di interesse mediante inserzione dei costrutti all'interno del vettore pGEM®-T Easy (Fig.47) della Promega e cercando di trasformare i ceppi di *E.coli* JM109.

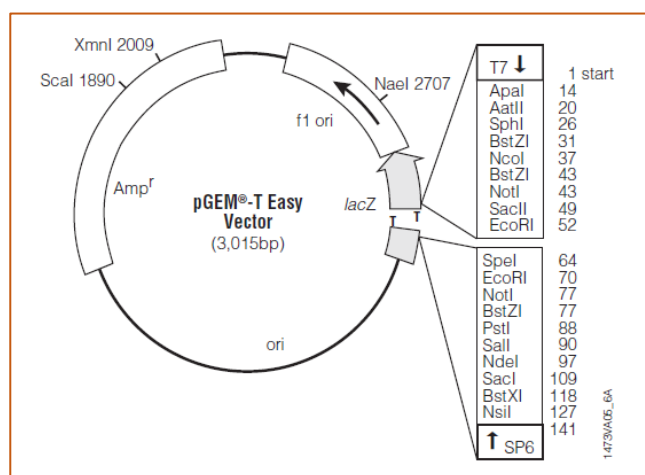


Figura 47. Vettore pGEM-T Easy utilizzato per il clonaggio delle sequenze. Il costrutto contiene il gene per la resistenza all'Ampicillina e il gene LacZa per lo screening bianco-blu.

Per la ligazione si è provveduto alla preparazione di 10 µL di miscela di reazione (Tab.12) per la quale sono stati utilizzati tre differenti rapporti molarli inserto:vettore per la reazione di ligazione che sono 1:1, 1:3 e 3:1, mentre per il controllo è stato utilizzato il rapporto ottimale consigliato di 1:1.

La quantità di inserto da utilizzare è stata calcolata mediante la formula riportata nel kit:

ng di vettore x Kb dell'inserto

x rapporto molare inserto:vettore

Kb del vettore

Componenti	Reazione standard	Controllo positivo	Controllo negativo
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligasi	5 µL	5 µL	5 µL
pGem®-T Easy Vector (50 ng)	1 µL	1 µL	1 µL
Inserto (prodotto di PCR)	X µL	-	-
Inserto di DNA controllo	-	2 µL	-
T4 DNA Ligasi (3 Weiss units/µL)	1 µL	1 µL	1 µL
Acqua Nuclease-free per volume finale di	10 µL	10 µL	10 µL

Tabella 12. Miscela di reazione per il clonaggio dei frammenti 4UP, 2UP e Gene Only all'interno del vettore pGEM-T Easy. I componenti della miscela fanno parte di un kit apposito per il vettore, il pGEM-T Easy Vector System della Promega.

Al termine del processo di ligazione dei frammenti all'interno del vettore, si è proceduto con la trasformazione delle cellule JM109 attraverso Heat-Shock con 2 µL di miscela di ligazione e, dopo incubazione con 950 µL di terreno LB liquido per 1h e 30 minuti a 37°C a 150 rpm, 100 µL di sospensione batterica sono stati piastrati in terreno LB agarizzato con Ampicillina, IPTG e X-Gal.

Dalle piastre sono state prelevate le colonie bianche che sono state risospese e fatte crescere overnight in terreno LB liquido contenente Ampicillina a 37°C e 150 rpm.

Si è proceduto, dunque, con la colony PCR mediante primers che legano sequenze interne al gene LIN5, al fine di ottenere la conferma della presenza di quest'ultimo.

È stato effettuato anche un ulteriore tentativo di clonaggio delle tre sequenze di interesse, utilizzando il kit *In-Fusion® HD Cloning* (Takara Bio USA), che permette un clonaggio rapido e direzionale.

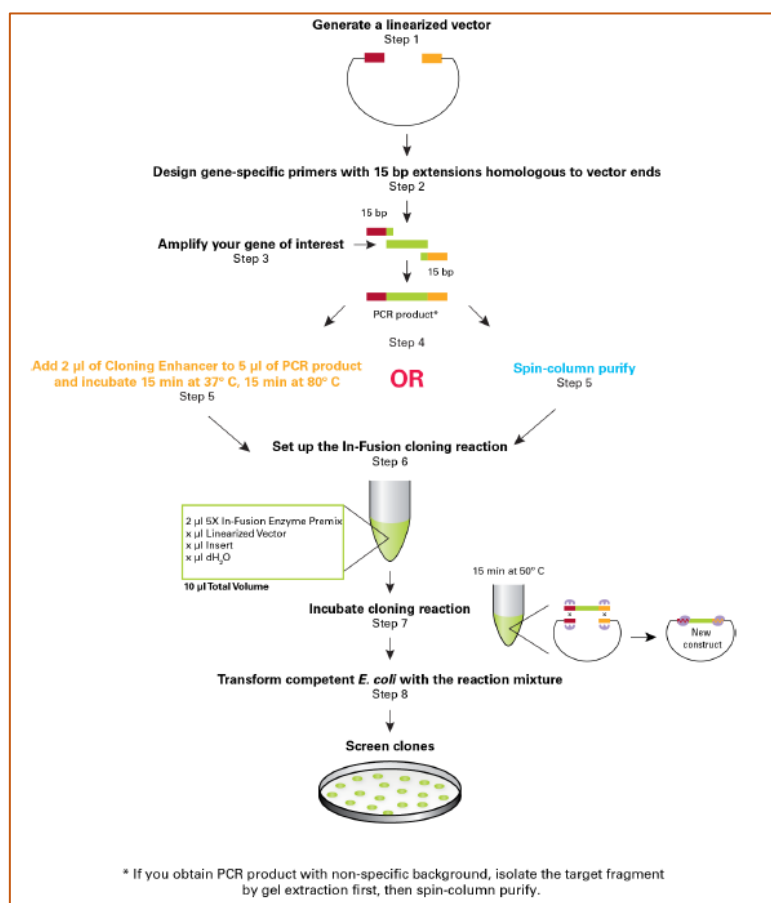


Figura 48. Step per la clonazione mediante kit *In-Fusion HD Cloning* (Takara Bio).

Il primo step consiste nella digestione e linearizzazione mediante enzima di restrizione fornito dal kit del vettore pGreenII. Per ottenere un'alta resa del processo, è consigliato incubare il vettore per almeno tre ore o, in alternativa,

overnight con l'enzima. È necessario, poi, purificare il costrutto e verificare la concentrazione ottenuta di plasmide linearizzato mediante lettura spettrofotometrica al Nanodrop 2000.

Si passa, dunque, al secondo step, cioè alla progettazione dei primers per l'amplificazione degli inserti 4UP e 2UP, e che possiedono code aggiuntive di 15 bp complementari alle estremità del vettore linearizzato. I primers sono stati disegnati mediante l'utilizzo del tool Takara Bio (www.takarabio.com) e sono state seguite alcune regole consigliate dal kit stesso per creare primers efficienti. In generale, i primers devono avere una temperatura di melting (T_m) compresa tra 58–65°C e la differenza tra le T_m dei due primers deve essere di $\leq 4^\circ\text{C}$.

A questo punto si è proceduto con lo step 3 che consiste nell'amplificazione dell'inserto a cui segue la purificazione direttamente da gel di agarosio mediante il kit NucleoSpin® Gel della Takara Bio provvisto di colonne con filtro in silice in grado di legare efficientemente gli acidi nucleici e di rimuovere i residui di gel attraverso diversi passaggi di centrifugazione e di lavaggio.

Una volta ottenuti gli inserti, è stato possibile procedere con la ligazione del vettore con l'inserto (step 5) preparando 10 μL di miscela di reazione che contiene una quantità di vettore-inserto in rapporto 1:1 e 2 μl di 5X In-Fusion HD Enzyme Premix, che contiene l'In-Fusion Enzyme, una ligasi in grado di

riconoscere piccole sequenze di 15 bp e di legarle rapidamente e con alta precisione.

Il tutto viene portato a volume mediante aggiunta di acqua deionizzata e si mette ad incubare nel termociclatore per 15 minuti a 50°C.

Per comprendere se è avvenuta la corretta ligazione si utilizzano due controlli, il vettore in forma circolare a concentrazione nota e un vettore contenente un inserto di 2Kb, fornito dal il kit e già purificato. Si trasformano, dunque, le cellule Stellar competenti fornite con il kit attraverso Heat Shock.

Per la verifica è stata effettuata la Colony PCR preparando la miscela di reazione con la GoTaq® DNA Polymerase e il buffer specifico 5X Green GoTaq® Reaction Buffer entrambi della Promega (Tab.13).

Reagenti	Conc. Iniziale	Volumi	Conc. Finale
Green GoTaq Flexi Buffer	5 X	4 µL	1 X
dNTPs	10 mM	0,4 µL	0,2 mM
MgCl₂ solution	25 mM	1,2 µL	1,5 mM
Primer forward	20 µM	0,2 µL	0,2 µM
Primer reverse	20 µM	0,2 µL	0,2 µM
Template DNA	40 ng	10 µL	40 ng
Go Taq G2 Flexi DNA Polimerasi	5U/µl	0,16 µL	5U/µl
H₂O nuclease-free	-	3,84 µL	-
Volume Totale	-	20 µL	-

Tabella 13. Miscela di reazione per la Colony PCR per verifica del clonaggio degli inserti mediante kit In-Fusion Cloning.

Le condizioni di reazione al termociclatore sono:

94°C → 5 min	}	1 h e 30 min
94°C → 30 sec		
40°C → 30 sec		
72°C → 30 sec		

Si è proceduto, dunque, con la trasformazione dei ceppi LBA4404 e AGL1 di *A.tumefaciens*, contenenti già il plasmide pSoup (9275 bp), mediante elettroporazione con i plasmidi pGreen_4UP (13000 bp), pGreen_2UP (110000 bp) e con il controllo pGreen0029 (4632 bp).

Gene editing

3.6 Schema sperimentale

Per introdurre lo SNP²⁸⁷⁸ mediante la tecnica del Gene editing e utilizzando il sistema CRISPR-Cas9, è stato scelto il metodo di clonaggio *Golden Gate Assembly* (Fig.).

Questo metodo permette un assemblaggio simultaneo e direzionale di più frammenti di DNA all'interno di un singolo vettore utilizzando un enzima di restrizione di tipo II e la T4 DNA ligasi, quest'ultima in grado di resistere a temperature più alte rispetto alle normali ligasi.

Dovendo inserire in un vettore accettore di grandi dimensioni frammenti differenti, quali il gene per la sgRNA, il DNA Donor, il gene per l'endonucleasi Cas9 e le sequenze virali SIR-REP-LIR, si è deciso di suddividere l'assemblaggio in tre livelli (Fig.): il *Livello 0*, nel quale si procede con l'estrazione delle sequenze Donor, SIR-REP-LIR e sgRNA dai ceppi di *E.coli* che li contengono e si effettuano l'amplificazione e il clonaggio all'interno dei vettori di Livello 1. Del Livello 0 fa parte anche il processo di domesticazione del Donor. Nel *Livello 1*, invece, sono state amplificate prima e clonate poi nel Vettore Accettore, che rappresenta il *Livello 2*, le sequenze del Donor domesticato, del sgRNA con lo specifico promotore aggiunto, le sequenze SIR-REP-LIR e la sequenza Linker.

Il Vettore Accettore è il costrutto che utilizzato per la trasformazione dei ceppi LBA4404 e AGL1 di *Agrobacterium tumefaciens*.

Per evitare che le sequenze siano inserite in modo errato all'interno dei vettori e che ci possano essere errori di inserimento tra i vari livelli, si è deciso di utilizzare due differenti enzimi di restrizione: l'enzima **BsaI**, per l'assemblaggio dei vettori di livello 1 e l'enzima **BpiI** per il clonaggio del vettore accettore (Livello 2).

Quest'ultimo contiene il gene per l'endonucleasi Cas9 e il marker di selezione NPTII che codifica per la Neomicina fosfotransferasi II, un enzima in grado di idrolizzare la Kanamicina, oltre che il gene *ccdB*, codificante per una proteina ad azione tossica poiché in grado di legarsi all'enzima DNA girasi A, formando un complesso con il DNA che non può essere risolto. Il gene *ccdB* serve per effettuare lo screening delle cellule trasformate.

Il Donor è una sequenza di 2012 bp e consiste nella sequenza del gene LIN5 di *S. lycopersicum* depositata in GeneBank, ma con l'unica differenza che risiede nello SNP²⁸⁷⁸, dove la **A** del *S. lycopersicum* è stata sostituita con la **T** del *S. pennellii*.

La sequenza è stata fatta sintetizzare dall'azienda Eurofins Scientific ed è stata clonata nel vettore pEX-A258.

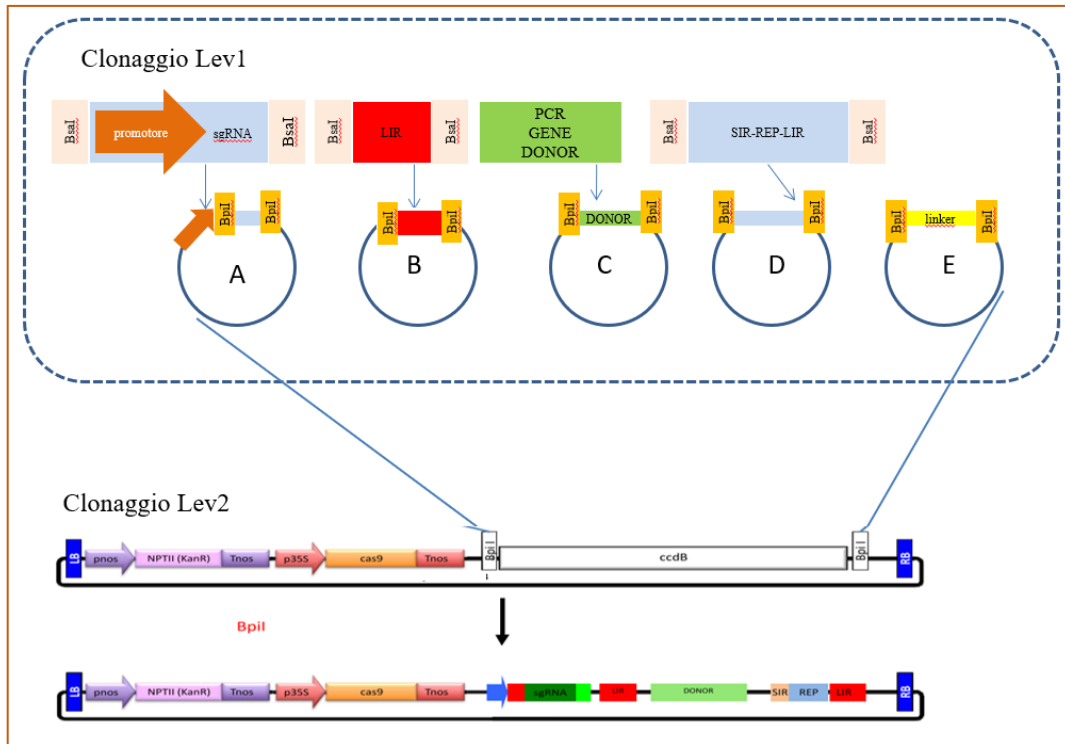


Figura 49. Schema riassuntivo dell'assemblaggio del costrutto per il Gene editing mediante clonaggio suddiviso in tre livelli delle sequenze Donor, sgRNA, SIR-REP-LIR e Linker.

3.7 Preparazione dei costrutti

Attraverso l'analisi bioinformatica della sequenza dell'esone 3 del gene LIN5 del *S.lycopersicum* (Exon name: Solyc09g010080.2.1.3 ; Location: SL2.50ch09:3477092..3478113), che presenta lo SNP²⁸⁷⁸ di interesse, sono stati individuati i 3 **RNA guida** più efficienti.

L'analisi è stata condotta impiegando 3 software dedicati a tal fine, il **GT-Scan** (<https://gt-scan.csiro.au/>), il **Cas-Designer** (<http://www.rgenome.net/cas-designer/>) e il **CRISPR direct** (<https://crispr.dbcls.jp/>) e i risultati ottenuti sono stati confrontati tra loro ed è stata scelta la guida che ha presentato una maggiore efficienza "in silico", cioè che non ha mostrato siti off-target.

L'efficienza della sgRNA è stata valutata mediante il **sistema Hairy roots** che prevede l'infezione di espianti ricavati da cotiledoni dei genotipi di interesse, in questo caso il solo CREA-SAAB, con *Agrobacterium rhizogenes* trasformato con il vettore accettore contenente la sequenza Donor di interesse e il sgRNA scelto (Ron et al., 2014). Le radici prodotte dagli espianti infettati vengono prelevate e sottoposte a PCR mediante il kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific) al fine di verificare il taglio operato dalla Cas9 e la sostituzione della sequenza genomica con il Donor introdotto.

Sulla base della guida individuata è stato sintetizzato il **Donor** di 2012 bp che è stato necessario **domesticare**, cioè sono state introdotte modifiche utili

all'interno della sequenza affinché tutto il processo di taglio ed inserzione vada a buon fine. La modifica inserita è stata la sostituzione sinonima di un singolo nucleotide (AGT → AGC) nella regione di binding dell'RNA guida, in questo modo la Cas9 non digerirà il Donor, ma solo la sequenza nel sito target genomico.

La domesticazione della sequenza Donor è stata condotta attraverso 3 PCR a partire dal vettore pEX-A258 e utilizzando 3 coppie di primers specifiche e differenti. Il kit utilizzato è quello della CloneAmp HiFi PCR Premix della Takara Bio che fornisce una miscela di reazione completa e pronta all'uso (Tab.14) e permette un'amplificazione del DNA efficiente.

Reagenti	Conc. Iniziale	Volumi	Conc. Finale
CloneAmp HiFi PCR Premix	2X	12,5 µL	1X
<i>Primer forward</i>	20 µM	0,3 µL	0,2 µM (5 pmol)
<i>Primer reverse</i>	20 µM	0,3 µL	0,2 µM (5 pmol)
Template DNA	< 100 ng	1 µL	< 100 ng
H₂O nuclease-free	-	5,9 µL	-
Volume Totale		25 µL	

Tabella 14. Componenti del kit CloneAmp HiFi PCR Premix della Takara Bio e rispettive concentrazioni iniziali e finali e i volumi utilizzati per la preparazione della miscela di reazione.

Le condizioni di reazione impostate al termociclatore sono riportate di seguito. Si è deciso di estendere a 30 secondi il terzo ciclo a 72°C in quanto il protocollo consiglia di calcolare 5 secondi per chilobase.

98°C → 10 sec }
 55°C → 15 sec } 35 cicli
 72°C → 30 sec }

Il livello 0 è composto dai plasmidi 1, 2 e 3 (Fig.50) contenenti rispettivamente il gene codificante per il sgRNA, la sequenza LIR e le sequenze SIR-REP-LIR, le ultime due proprie del Geminivirus, e tutte queste sequenze, insieme alla sequenza Donor domesticata, devono essere assemblate nei **vettori di livello 1**.

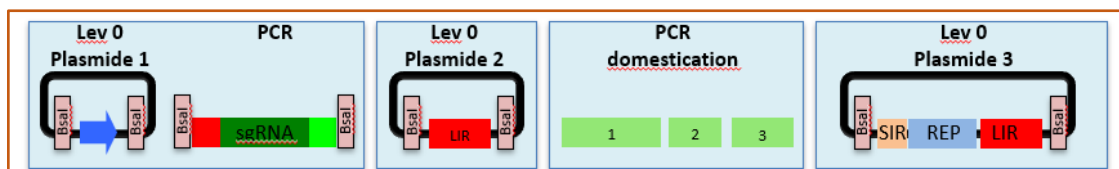


Figura 50. Vettori di Livello 0 contenenti la sequenza del sgRNA, il LIR e SIR-REP-LIR. Il Donor deve essere domesticato, dunque amplificato in tre frammenti.

I costrutti sono stati estratti e purificati dai ceppi di *E.coli* all'interno dei quali sono stati spediti attraverso il kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System della Promega. Si è proceduto, dunque, con l'amplificazione della sequenza del sgRNA, lunga 165 bp, mediante kit CloneAmp HiFi PCR Premix della Takara Bio.

Per l'amplificazione il primer forward è stato disegnato sulla sequenza wild-type del gene Lin5 di *Solanum pennellii* scaricata da **Sol Genomics Network** (www.solgenomics.net) e contiene il *DNA target*, mentre il primer reverse è

universale. La *temperatura di melting* della coppia di primers è di 55°C. Le condizioni di reazione impostate al termociclatore sono:

98°C → 10 sec
55°C → 15 sec
72°C → 5 sec

} 30 cicli

È stata effettuata una verifica del DNA amplificato attraverso elettroforesi su gel di agarosio al 3% ed è stato visualizzato mediante il sistema fotografico Kodak 1D 3.6 e Bromuro di Etidio.

Una volta ottenuti gli inserti amplificati e purificati, e una volta verificata la quantità di costrutto ottenuto mediante lettura spettrofotometrica al NanoDrop™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), si è potuto procedere con l'**assemblaggio dei vettori di livello 1** (Fig.51) che sono il **Plasmide 4**, vettore all'interno del quale deve essere inserito il sgRNA, il **Plasmide 6**, che deve contenere il DNA Donor domesticato, e il **Plasmide 8**, vettore che possiede la sequenza Linker.

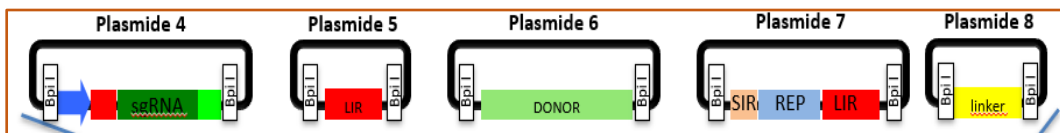


Figura 51. Vettori di Livello 1 contenenti il sgRNA con l'opportuno promotore, il LIR, il Donor domesticato, SIR-REP-LIR e la sequenza Linker.

Il kit utilizzato per l'estrazione e la purificazione dei vettori è sempre il Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System della Promega, mentre l'amplificazione degli inserti è stata effettuata con il kit CloneAmp HiFi PCR

Premix della Takara Bio. Una volta ottenuti gli amplificati si è proceduto con l'assemblaggio nei vettori di Livello 1.

È stato necessario unire nell'ordine giusto i tre frammenti amplificati P1, P2 e P3 in cui è stato suddiviso il DNA

Donor (Fig.52), per poi poterlo inserire come frammento

unico nel plasmide 6, ma è anche stato inserito il gene per

l'RNA guida all'interno del plasmide 4 (Tabelle 15 e 16).

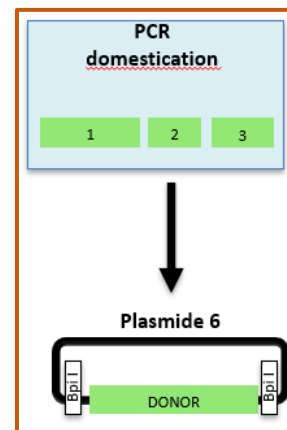


Figura 52. Per procedere con l'assemblaggio dei vettori di Livello 1, i tre frammenti del Donor devono essere ligati e clonati all'interno del plasmide 6.

Dig-Lig_Livello 1_Donor			
<i>Reagenti</i>	<i>Conc. iniziale</i>	<i>Volumi</i>	<i>Conc. finale</i>
Plasmide 6	100 ng/ μ L	1 μ L	34,62 fmol
P1	24,9 ng/ μ L	2,7 μ L	69,92 fmol
P2	24,1 ng/ μ L	2,16 μ L	54,2 fmol
P3	8 ng/ μ L	2,73 μ L	22,71 fmol
BsaI-HF	20 U/ μ L	1 μ L	20 U
T4 ligasi	400 U	0,5 μ L	200 U
Ligase Buffer	10 X	1,5 μ L	1 X
BSA	10 X	1,5 μ L	1X
H₂O		1,71 μ L	
Volume Totale		15 μ L	

Tabella 15. Ligazione dei tre frammenti del Donor e clonaggio all'interno del plasmide 6. In tabella sono riportati i componenti della miscela con le rispettive concentrazioni finali ed iniziali ed i volumi utilizzati.

Dig-Lig_Livello 1_sgRNA			
<i>Reagenti</i>	<i>Conc. Iniziale</i>	<i>Volumi</i>	<i>Conc. finale</i>
Plasmide 4	100 ng/ μ L	1 μ L	34,62 fmol
sgRNA	3,8 ng/ μ L	2,2 μ L	228,8 fmol
Plasmide 1	100 ng/ μ L	2,21 μ L	229,84 fmol
BsaI-HF	20 U/ μ L	1 μ L	20 U
T4 ligasi	400 U	0,5 μ L	200 U
Ligase Buffer	10 X	1,5 μ L	1 X
BSA	10 X	1,5 μ L	1 X
H₂O		4,98 μ L	
Volume Totale		15 μ L	

Tabella 16. Golden Gate Assembly del sgRNA all'interno del plasmide 4. In tabella sono riportati i componenti della miscela con le rispettive concentrazioni finali ed iniziali ed i volumi utilizzati.

Le condizioni di reazione impostate al termociclatore sono per entrambe le digestioni-ligazioni uguali e il tempo impiegato per completare l'intero ciclo è stato di circa tre ore e mezza.

37°C → 20 sec	} 27 cicli
37°C → 3 min	
16°C → 4 min	
50 °C → 5 min	
80°C → 5 min	

I costrutti sono stati estratti e purificati direttamente da gel mediante il kit di purificazione Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System della Promega a cui è seguito il clonaggio all'interno di ceppi di *E.coli* JM109 competenti come descritto nel capitolo 3.3.

I batteri trasformati sono stati piastrati in terreno LB agarizzato contenente Ampicillina (100 mg/mL), per la selezione dei cloni trasformati, e IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 µg/mL) per effettuare il test bianco-blu e sono stati messi ad incubare a 37°C overnight.

Per la verifica dei costrutti contenuti all'interno delle colonie trasformate si è proceduto con la colony PCR effettuata prelevando una colonia bianca per ciascuna piastra e disciogliendo le colonie in 30 µL di acqua sterile MilliQ sotto cappa. Per preparare i 20 µL di miscela di reazione sono stati prelevati 10 µL della sospensione cellulare e sono stati aggiunti i componenti della miscela di reazione (Tab.17).

Reagenti	Conc. Iniziale	Volumi	Conc. finale
Green GoTaq Flexi Buffer	5 X	4 µL	1 X
dNTPs	10 mM	0,4 µL	0,2 mM
MgCl₂ solution	25 mM	1,2 µL	1,5 mM
Primer forward	20 µM	0,2 µL	0,2 µM
Primer reverse	20 µM	0,2 µL	0,2 µM
Template DNA	-	10 µL	40 ng
Go Taq G2 Flexi DNA Polimerasi	5U/µL	0,16 µL	5U/µL
H₂O nuclease-free	-	3,84 µL	-
Volume Totale	-	20 µL	-

Tabella 17. Componenti della miscela di reazione della Colony PCR con rispettive concentrazioni iniziali e finali ed i volumi utilizzati.

La coppia di primers utilizzata per amplificare il gene codificante per il sgRNA è la stessa utilizzata per l'amplificazione della sequenza dal vettore di Livello 0, mentre per la sequenza Donor è stato utilizzato come primers forward, una

sequenza che lega a porzione del terminatore TNos della cassetta di espressione per la Cas9, mentre come primer reverse è stata utilizzata una sequenza che riconosce un sito interno al tratto RB.

Le condizioni di reazione impostate al termociclatore per il Donor sono:

95°C → 5 min
 95°C → 1 min
 55°C → 1 min
 72°C → 1 min

35 cicli

Mentre le condizioni di reazione per il sgRNA sono:

95°C → 5 min
 95°C → 15 sec
 55°C → 15 sec
 72°C → 5 min

35 cicli

Le colonie risultate positive alla Colony PCR sono state sequenziate prima di procedere al **clonaggio di livello 2** (Fig.) degli inserti nel vettore accettore secondo quanto riportato nella tabella 18.

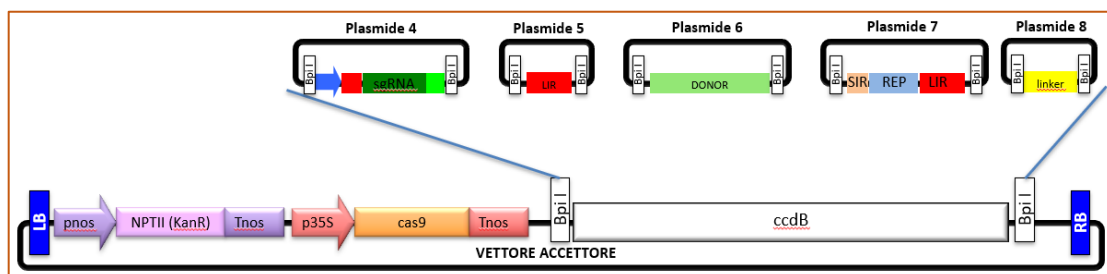


Figura 53. Golden Gate Assembly di Livello 2.

Golden Gate Assembly_Livello 2			
<i>Reagenti</i>	<i>Conc. Iniziale</i>	<i>Volumi</i>	<i>Conc. Finale</i>
Vettore accettore	30,50 fmol/ μ L	1 μ L	30,50 fmol/ μ L
sgRNA_plasmide 4	121,17 fmol/ μ L	0,27 μ L	121,17 fmol/ μ L
LIR_plasmide 5	135,66 fmol/ μ L	0,24 μ L	135,66 fmol/ μ L
Donor_plasmide 6	103,96 fmol/ μ L	0,32 μ L	103,96 fmol/ μ L
SIR-REP-LIR plasmide 7	82,25 fmol/ μ L	0,40 μ L	82,25 fmol/ μ L
Linker_plasmide 8	95,44 fmol/ μ L	0,35 μ L	95,44 fmol/ μ L
BpiI (NEB)	10 U/ μ L	1 μ L	10 U
T4 Ligase (NEB)	400 U/ μ L	0,5 μ L	200 U
Ligase buffer	10 X	1,5 μ L	1 X
BSA	10 X	1,5 μ L	1 X
H₂O	-	7,92 μ L	-
Volume Totale		15 μ L	

Tabella 18. Componenti della miscela del Golden Gate Assembly con relative concentrazioni iniziali e finali e volumi utilizzati.

Le condizioni di reazione impostate al termociclatore sono:

37°C → 20 sec	} 27 cicli
37°C → 3 min	
16°C → 4 min	
50°C → 5 min	
80°C → 5 min	

Il costrutto ottenuto è stato inserito in *E.coli* come descritto nel capitolo 3.3 e al fine di verificare la presenza di tutti i frammenti sono state effettuate tre PCR utilizzando tre coppie di primers differenti e il kit CloneAmp HiFi PCR Premix della Takara Bio.

Le condizioni di reazione impostate al termociclatore per l'amplificazione sono:

98°C → 10 sec
55°C → 15 sec
72°C → 4 min } 30 cicli **Donor**

98°C → 10 sec
55°C → 15 sec
72°C → 4 min } 30 cicli **sgRNA**

98°C → 10 sec
55°C → 15 sec
72°C → 2 min } 30 cicli **Inserito completo**

3.8 Esperimenti di trasformazione via *Agrobacterium tumefaciens*

Il protocollo di trasformazione utilizzato include tre fasi principali: la produzione del materiale vegetale di partenza, l'infezione mediata da *A. tumefaciens* e la rigenerazione e selezione dei trasformanti.

La durata del protocollo di infezione è di una settimana. Una colonia dei ceppi AGL1 e LBA4404 di *A. tumefaciens* trasformati con il costrutto di interesse viene inoculata in terreno contenente gli antibiotici selettivi opportuni. La coltura è stata posta in agitazione (150 rpm) a 28°C.

Il giorno seguente quando la coltura batterica ha raggiunto un valore di OD₆₀₀ compreso tra 0.5–1, viene centrifugata a 2500 rpm per 15 minuti, dopo di che si elimina il surnatante e si risospendono i batteri in 10 mL di MS a pH 5.5 contenente 20 g/L di saccarosio.

Nel frattempo, sono stati preparati gli espianti (circa 200, Fig.54) partendo da giovani cotiledoni prelevati dopo 10-12 giorni dalla germinazione avvenuta su terreno riportato in Tab., in fotoperiodo

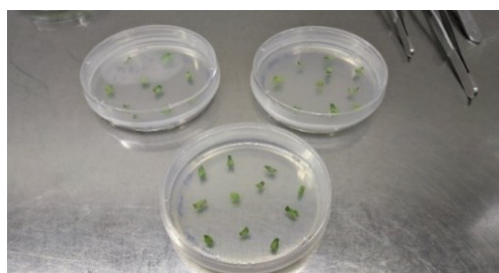


Figura 54. Espianti cotiledonari adagiati con la faccia adassiale su terreno P3.

(Grow lux) e a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, ai quali sono stati rimossi l'apice e la base e a cui è stato operato un taglio perpendicolare all'asse longitudinale del cotiledone. Gli espianti così ricavati sono stati adagiati con la faccia adassiale su terreno P3

(Tab.19) in piastre Petri per evitare la disidratazione e in seguito sono stati posti a contatto con la soluzione batterica per 15 minuti.

Al termine dell'incubazione gli espianti fogliari sono stati asciugati su carta assorbente sterile e successivamente sono stati posti su piastre Petri contenenti il substrato di rigenerazione ottimale P3 (Tab.19), scelto dalle prove di rigenerazione effettuate precedentemente.

Le piastre sono state messe al buio in cella climatica a 24°C per 2 giorni per favorire l'infezione e al termine dell'incubazione gli espianti sono trasferiti su substrati selettivi di rigenerazione contenenti l'agente selezionante Kanamicina (25mg/L o 50mg/L a seconda della varietà utilizzata) e Cefotaxime (250 mg/L). I tessuti in fase di selezione sono mantenuti in camera di crescita e trasferiti ogni due settimane su substrato fresco. La successiva radicazione è stata condotta sul substrato E3 come riportato in tabella 19.

Terreno	Sali	Saccarosio (g/L)	Vitamine	Agar (%)	pH	Ormoni
P3	MS	30	MS	0,7	5,8 KOH	1 mg/L Zeatina + 0,1 mg/L IAA (Ficcadenti et al., 1999)
E3	MS	20	MS	0,8	5,8 KOH	0,1 mg/L IAA (Ellul et al., 2003)
Germinazione	MS	10	MS	0,8	5,7 KOH	-

Tabella 19. Terreni utilizzati per la trasformazione degli espianti con A.tumefaciens e relativa composizione.

4. RISULTATI

4.1 Prove di rigenerazione

Dei 25 genotipi di pomodoro, da mensa e da industria, solo due genotipi, Cuor di Bue 2 e Cuor di Bue 3R non hanno prodotto germogli. Nel corso dell'esperimento è emerso che cotiledoni troppo piccoli ingialliscono e non sono in grado di formare callo e/o germogli, risulta pertanto fondamentale mettere in coltura i cotiledoni di giuste dimensioni ed età di sviluppo.

I cotiledoni, perciò, sono stati fatti sviluppare al massimo della loro grandezza, fino a quando la pianta non è in procinto di produrre le prime vere foglie, al fine di ottenere la migliore efficienza di rigenerazione. Inoltre, è stato visto che non tutti i cotiledoni dello stesso genotipo messi in coltura producono germogli. L'*efficienza di rigenerazione*, cioè la percentuale di germogli ottenuti, e l'*efficienza di radicazione*, cioè la percentuale di germogli formanti radici, per ogni genotipo e terreno utilizzato sono riportate in Tab.20, mentre in Fig.55 sono mostrati espianti e germogli in coltura.

Tra i genotipi più rispondenti sono stati scelti l'Ailsa Craig, che ha mostrato una capacità di formare germogli pari ad 1, e il SAAB-CRA, costituito presso il CREA-OF, Monsampolo del Tronto (AP) e afferente alla tipologia "Pera d'Abruzzo" avente una capacità di formare germogli pari a 0,86 (Tab.21).

Nel corso della rigenerazione è stato rilevato anche il *tempo di germinazione* impiegato dai diversi genotipi come anche il tempo impiegato per lo sviluppo di cotiledoni utilizzati negli esperimenti di trasformazione. I genotipi scelti sono risultati tra i più veloci a germinare e in grado di produrre cotiledoni dopo 8 giorni dalla messa in coltura. Come *genotipo di controllo* è stata utilizzata la linea L276, parentale maschile della varietà da industria Giasone, già utilizzata in precedenti esperimenti di trasformazione genetica per l'introduzione del gene DefH9-iaaM (Ficcadenti et al., 1999).

Genotipi	% di germogli ottenuti		% di germogli radicati	
	P3	E2	P5	P9
UC 82	0	0	0	0
Microtom	150	0	63	100
Money maker	0	0	0	0
Ailsa Craig	100	0	0	100
San Marzano 622	63	0	50	200
San Marzano 3	0	0	0	0
Cuor di Bue 1	50	0	100	100
Cuor di Bue 4R	50	0	0	0
Cuor di Bue 5R	86	0	67	100
Cuor di Bue 6R	0	0	0	0
Cuor di Bue 7	67	0	0	0
Allungato	40	0	200	400
Ciliegiino	20	0	0	0
CREA-SAAB	86	29	100	150
Pera d'Abruzzo	0	0	0	0
Riccio di Parma	36	0	67	100
LA 4104	30	0	0	0
CASTELONG	50	0	100	100
VF65	0	0	0	0
RED PEEL	0	0	0	0
ARIZONA	63	0	67	100
OVAL RED	0	0	0	0
PARMA MEC	75	0	80	100

Tabella 20. Elenco dei 26 genotipi utilizzati per le prove di rigenerazione.

ACCESSIONE	% DI GERMOGLI OTTENUTI	CAPACITA' DI FORMARE GERMOGLI
Ailsa Craig	100	1
CREA-SAAB	86	0,86
Cuor di Bue 5R	86	0,86

Tabella 21. Elenco dei 3 genotipi scelti sulla base della capacità di formare germogli.

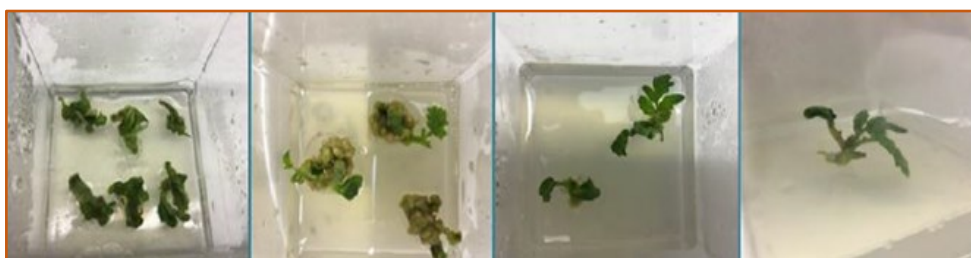


Figura 55. Espianti e germogli derivati da espanti in coltura.

Attraverso l'utilizzo di differenti substrati a concentrazione nota, invece, è stato possibile individuare il protocollo ottimale di rigenerazione che prevede l'utilizzo del terreno P3 (Ficcadenti *et al.*, 1999: 30 g/L di saccarosio, 1 mg/L zeatina, 0,1 mg/L IAA) per la “*Shoot induction*”, cioè per l'induzione della germinazione, e del terreno P9 (Sun *et al.*, 2006, 15 g/L di saccarosio) come “*Rooting medium*”, cioè come mezzo per lo sviluppo delle radici.

Sulla base dei risultati ottenuti nel corso degli esperimenti di trasformazione sono stati introdotti altri due substrati per la radicazione per quanto riguarda il Gene editing, che prevedono l'impiego degli ormoni IAA (Ellul *et al.*, 2003) e IBA (Vu *et al.*, 2020).

È stato ampiamente spiegato come lo SNP²⁸⁷⁸ sia responsabile del cambiamento di un singolo amminoacido, l'Asp³⁴⁸, localizzato vicino al sito catalitico dell'enzima invertasi e che determina l'aumento del grado Brix.

È stata, dunque, verificata la presenza dello SNP²⁸⁷⁸ sia nel *S. pennellii* che nei genotipi di *S. lycopersicum* risultati più rispondenti alla rigenerazione, San Marzano 622, Cuor di Bue 5R, Allungato, CREA-SAAB, Parma MEC, al fine di utilizzare cultivar appropriate per gli esperimenti, ma anche per disegnare primers specifici per l'amplificazione della sequenza di 317 bp contenente lo SNP (Fig.56).

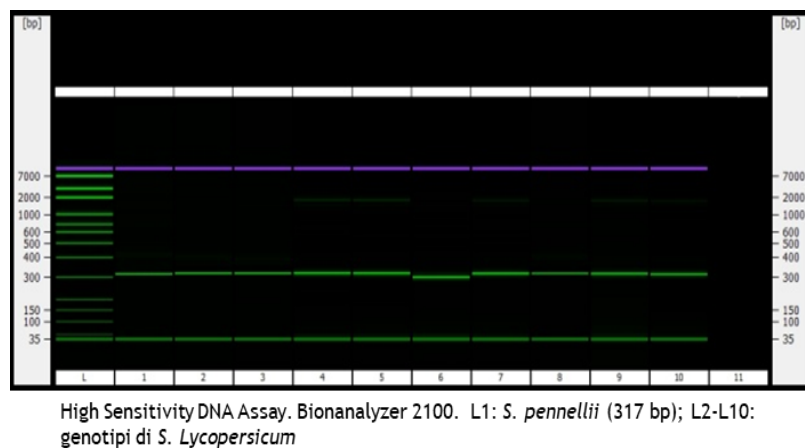


Figura 56. Analisi dell'amplicone di 317 bp contenente lo SNP²⁸⁷⁸ sulle cultivar maggiormente rispondenti al protocollo di rigenerazione. Si può vedere come tutte le cultivar presentano bande corrispondenti alla grandezza attesa, dunque contengono la sequenza di interesse e possono essere utilizzati per gli esperimenti di Cisgenesi e Gene editing.

Gli ampliconi sono stati sequenziati mediante il PyroMarkQ24 (Qiagen) impiegando primers di sequenza per un frammento di 78 bp comprendente lo SNP. I primers marcati sono stati disegnati utilizzando il software apposito

dello strumento, il Pyrosequencing Assay Design, e successivamente inviati al servizio di sequenziamento della Qiagen per conferma (Fig.57).

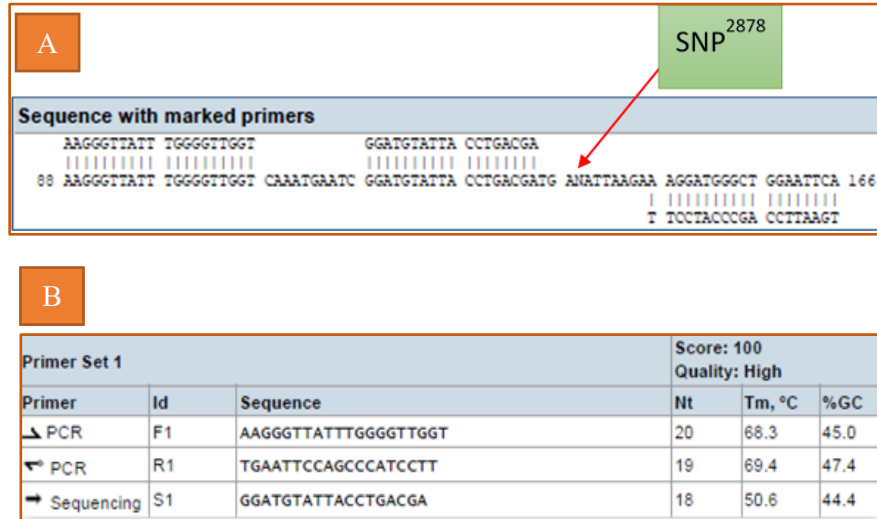


Figura 57. a) Disegno dei primers sulla sequenza contenente lo SNP²⁸⁷⁸; b) Sequenze dei primers disegnati

Il risultato ottenuto non ha evidenziato la sequenza dei genotipi amplificati (Fig.58)., perciò si è deciso di far analizzare le bande di 317 bp dei genotipi scelti, recuperate dal gel di agarosio, all'azienda Eurofins a cui sono state inviate.

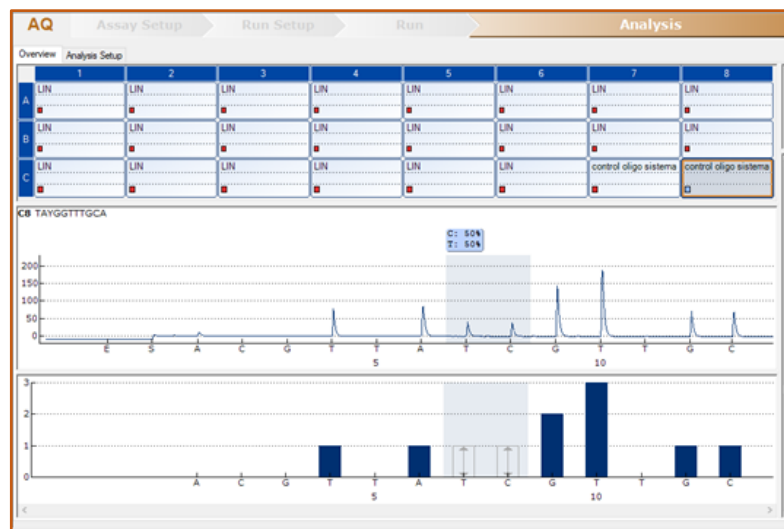


Figura 58. Esito negativo del sequenziamento mediante PyroMarkQ24.

Il risultato ottenuto dal sequenziamento sia della linea LA716 che delle accessioni scelte ha confermato la presenza dello SNP: GAT in *S. pennellii* e GAA nei genotipi di *S. lycopersicum* (Fig.59)

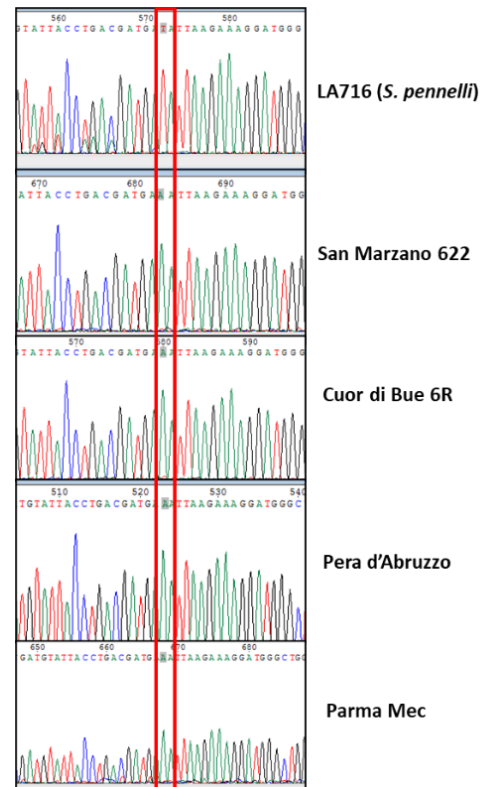
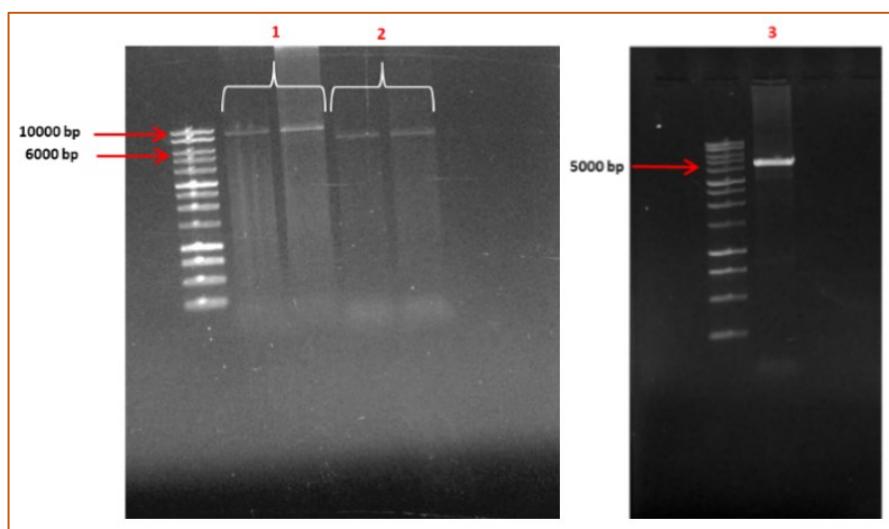


Figura 59. Risultato sequenziamento Eurofins che evidenzia la presenza dello SNP²⁸⁷⁸.

4.2 Cisgenesi

Per gli esperimenti di cisgenesi sono stati preparati due inserti di grandezze differenti per entrambi i ceppi AGL1 e LBA4404 di *A.tumefaciens*: il costrutto denominato **2UP**, di 7329 bp, contenente il terzo esone del gene LIN5, 2000 bp a monte del promotore nativo del gene e 500 bp a valle del terminatore; mentre il costrutto **4UP**, di 9829 bp, contenente sempre il terzo esone del gene LIN5, ma anche 4000 bp a monte del promotore nativo del gene e 1000 bp a valle del terminatore. La grandezza dei costrutti è stata determinata sulla base della sequenza del *S. pennelli* depositata nel National Center for Biotechnology Information (NCBI). Il terzo esone del gene LIN5 inserito nei costrutti è quello appartenente alla linea LA716 di *S.pennellii* e i vettori sono stati clonati all'interno dei ceppi JM109 di *E.coli* a cui è seguita la verifica mediante amplificazione con primers disegnati sulla sequenza del gene LIN5 (Fig.).

Figura 60. Risultati elettroforetici per gli inserti 4UP, 2UP e Gene Only. Le prime due colonne (num.1) rappresentano il 4UP (9800 bp), le due colonne con il num.2 riportano le bande del 2UP (7000 bp), mentre la terza colonna è il Gene Only (4820 bp).



I frammenti amplificati, il 2UP, il 4UP e il Gene Only, sono stati inseriti mediante pGEM®-T Easy Vector System della Promega all'interno del vettore pGEM®-T Easy usando tre diversi rapporti molari inserto:vettore (1:1, 1:3, 3:1) e i costrutti sono stati clonati all'interno di cellule JM109 di *E.coli* competente tramite tecnica dell'Heat Shock.

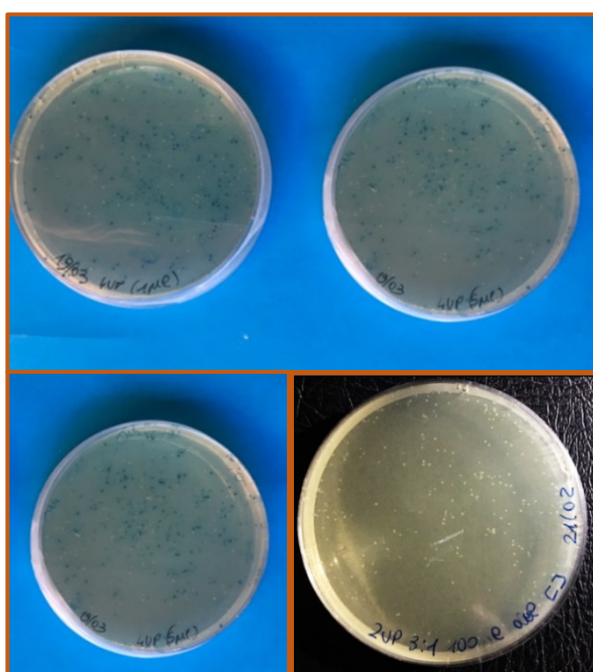


Figura 61. Test bianco-blu per il clonaggio degli inserti 4UP, 2UP e Gene Only nel vettore pGEM-T Easy.

Come si può osservare dalla Fig.61, dopo incubazione overnight, sono state ottenute colonie trasformate, anche se non numerose, e sono state analizzate effettuando la colony PCR (Fig.) utilizzando primers che riconoscono sequenze interne al gene LIN5, al fine di ottenere la conferma della presenza di quest'ultimo.

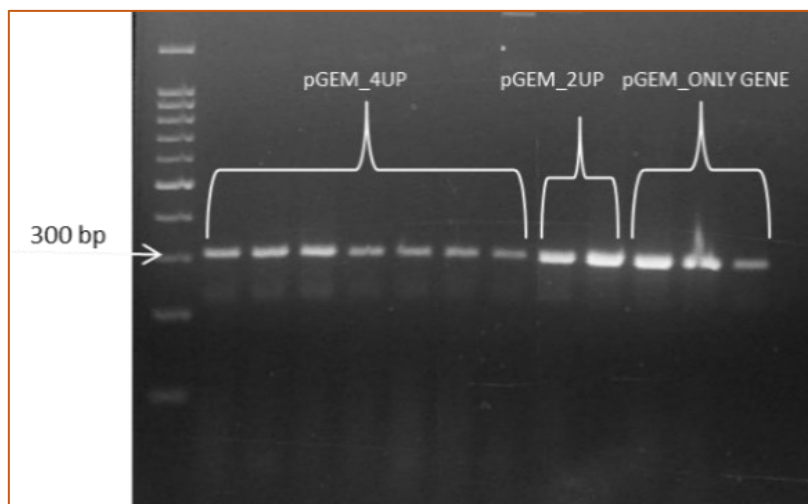


Figura 62. Risultati elettroforetici della Colony PCR per la verifica della presenza degli inserti 4UP, 2UP e Gene Only all'interno del vettore pGEM-T Easy.

I frammenti amplificati sono stati inseriti nel vettore pGREEN II e sono stati clonati in ceppi di *E.coli* JM109 competenti al fine di poterli utilizzare per la trasformazione dei ceppi di *A.tumefaciens* ma, data la grandezza dei frammenti, non è stato possibile recuperare le bande amplificate dal gel di agarosio in quanto mostravano un segnale molto debole.

È risultato, perciò, difficile procedere al clonaggio degli inserti nel vettore pGREENII e, dunque, alla conseguente trasformazione dei ceppi di *A.tumefaciens*, contenenti già il plasmide helper pSoup, attraverso elettroporazione.

È stato, dunque, deciso di utilizzare il kit In-Fusion Cloning (Takara Bio) specifico per il clonaggio di frammenti di grandi dimensioni, infatti consente la clonazione indipendentemente dalla ligazione dei prodotti di PCR in qualunque vettore e in qualsiasi sito di restrizione.

I costrutti ottenuti sono stati validati mediante colony PCR e ulteriore sequenziamento ed entrambe le verifiche hanno confermato la presenza dello SNP²⁸⁷⁸ (Fig.63).

A seguito dei controlli ad esito positivo dei vettori, i ceppi LBA4404 e AGL1 di *A. tumefaciens* sono stati elettroporati con i plasmidi pGreenII 2UP o 4UP, di 11000 bp e 13000 bp rispettivamente, e il plasmide pGreen-NOS-KAN-NOS, contenente il gene NPT-II per la resistenza alla kanamicina, di 4632 bp.

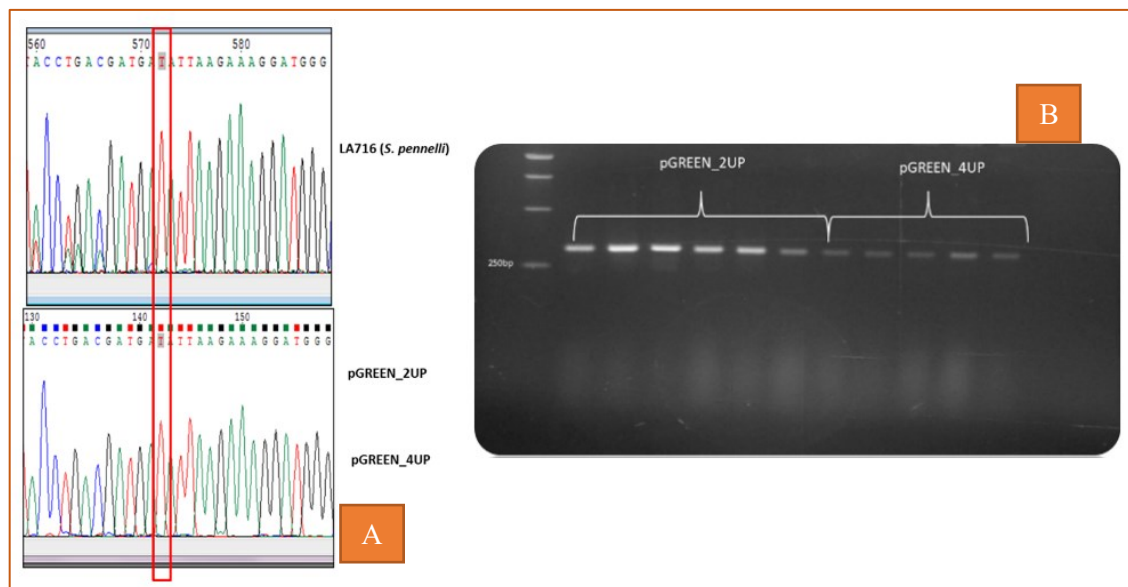


Figura 63. a) Sequenziamento ed analisi delle sequenze ottenute dai costrutti clonati; b) Colony PCR dei frammenti clonati

I costrutti verificati sono stati impiegati negli *esperimenti di co-trasformazione* degli espianti dei genotipi di pomodoro CREA-SAAB e Ailsa Craig di *S.lycopersicum* e come controllo è stato utilizzato il plasmide pGreen0029 contenente il solo gene per la resistenza alla Kanamicina.

Costrutti	CREA-SAAB		Ailsa Craig
	LBA4404	AGL1	AGL1
pSoup_pGreen0029	100	100	100
pSoup_pGreen_4 UP	150	100	100
pSoup_pGreen_2 UP	150	100	100

Tabella 22. Numero di espianti utilizzati per ciascun costrutto e per ciascun genotipo scelto dopo prove di rigenerazione.

Non sono stati ottenuti germogli e piante cisgeniche da tutte le prove di co-trasformazione effettuate (Tab.22) e le criticità del procedimento sono state individuate nella grandezza degli inserti, rispettivamente di 9829 bp per il 4UP o di 7329 bp per il 2UP, da introdurre nella cellula vegetale. Inoltre, il sistema di co-trasformazione, che prevede l'impiego di più plasmidi, quali il pSoup (plasmide helper), il pGreen (4UP o 2UP) e il pGreen0029 (resistenza alla Kanamicina), seppure attualmente sia reputato il più efficiente, non è risultato adatto per l'utilizzo di frammenti molto grandi.

Per ovviare al problema, sulla base di ricerche bibliografiche, si è pensato di utilizzare un sistema differente che prevede l'impiego di un unico vettore binario, il **pBINAW-PASSA**, fornito dal prof. Vossen dell'Università di Wageningen, il quale costrutto è fornito di un sito di clonazione, nel quale devono essere clonati i frammenti 2UP, 4UP o il Gene Only e di un sistema di selezione basato sul gene NPTIII. Questo sistema prevede l'impiego di enzimi di restrizione apposti per il vettore e il disegno di primers specifici per

l'amplificazione dei frammenti da clonare (Fig.). Gli esperimenti per la preparazione dei costrutti con questo nuovo vettore sono in corso.

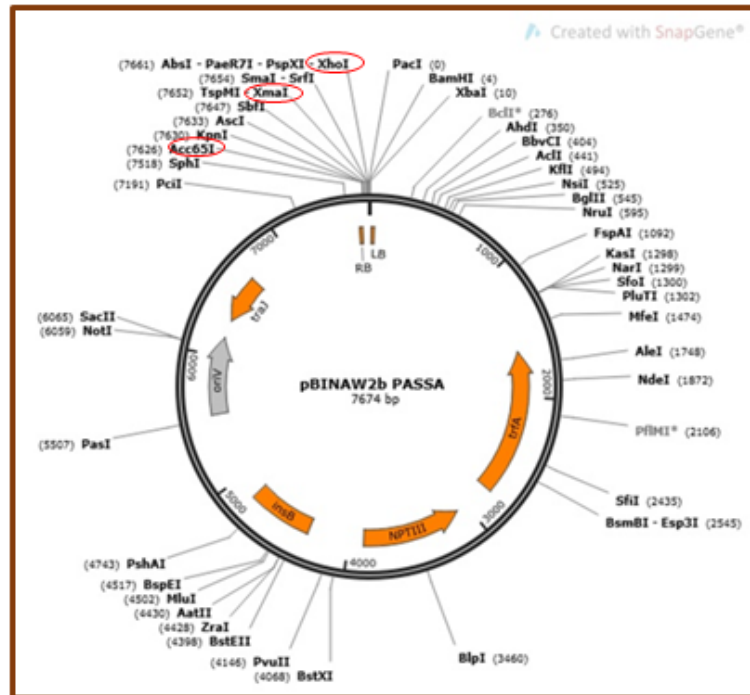


Figura 64. Mappa del plasmide pBINAW-PASSA generata con SnapGene. I siti di restrizione che si è deciso di utilizzare sono XmaI, XhoI e Acc65I.

4.3 Gene editing

Per l'approccio del Gene Editing si è ricorso al sistema CRISPR/Cas9 mediante l'impiego di vettori virali BeYDV TSL, che sono costrutti basati sul genoma del Virus del fagiolo giallo nano, un Geminivirus, e che in letteratura hanno evidenziato una maggiore efficienza di Ricombinazione omologa (Dahan-Meir *et al.*, 2018; Cermak *et al.*, 2015).

La prima fase affrontata per questa tecnica è stata quella della *scelta delle guide* mediante analisi bioinformatica, condotta mediante l'uso di tre software sulla sequenza dell'esone 3 del gene LIN5 del *S. lycopersicum* in cui è presente lo SNP²⁸⁷⁸. Il confronto dei risultati ottenuti dai tre differenti software ha permesso di individuare 3 guide valide per l'utilizzo in esame e tra queste è stata scelta quella che riconosce una sequenza di 54 bp a valle dello SNP²⁸⁷⁸ (Fig.65).



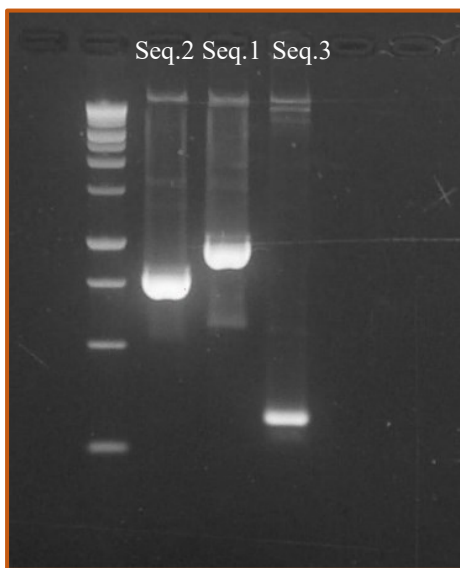
Figura 65. Le 3 guide ottenute mediante analisi con 3 differenti software. La sequenza evidenziata in verde corrisponde alla guida scelta per la ricerca in esame.

Questa guida è stata scelta, oltre che per le caratteristiche bioinformatiche di maggiore efficienza “in silico” che corrisponde all'assenza di *siti off-target*, per il fatto che risulta quella più prossima allo SNP, sebbene si leghi al filamento in direzione inversa (-).

Sulla base della guida scelta, è stato individuato il Donor di 2012 bp che consiste in un tratto della sequenza di LIN5 di *S. lycopersicum* che presenta una sostituzione a livello dello SNP²⁸⁷⁸ nel quale è stata sostituita la **A** presente in *S. lycopersicum* con la **T** propria del *S. pennellii*.

È stato necessario *domesticare* la sequenza del DNA Donor (**Livello 0**), sintetizzato dall'azienda Eurofins e inserita nel vettore pEX-A258 (Fig.68), per potere essere inserito nei vettori TSL al fine di proteggere la sequenza da eventuali tagli da parte della Cas9, dunque è stata operata la sostituzione sinonima di un singolo nucleotide (AGT → AGC) nella regione di binding dell'RNA guida (Fig.66, Tab.23).

La domesticazione è stata effettuata attraverso tre differenti PCR con tre coppie di primers specifiche aventi code aggiuntive per l'inserimento dei siti di restrizione per BsaI, fondamentali per la futura ligazione delle sequenze, al fine di amplificare i tre frammenti in cui la sequenza del Donor è stata suddivisa (Fig.66). La sequenza dell'RNA guida e il linker, invece, sono state prima amplificate (Fig.71) e poi clonate sempre mediante Golden Gate Assembly.



Costrutto **Concentrazione**
($\lambda=260$ nm)

P1	24,9 ng/ μ L
P2	24,1 ng/ μ L
P3	8 ng/ μ L

Tabella 23. Concentrazione misurata al Nanodrop dei tre frammenti P1, P2 e P3 in cui è stato suddiviso il Donor.

Figura 66. Risultato dell'amplificazione dei tre frammenti del Donor (domesticazione).

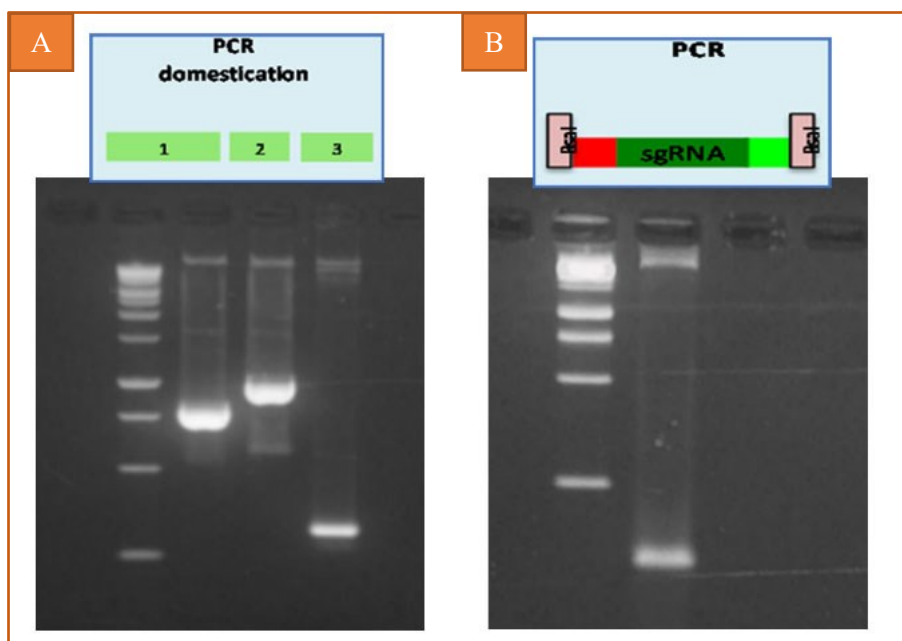


Figura 67. a) Risultati della Domesticazione del Donor; b) Amplificazione del sgRNA

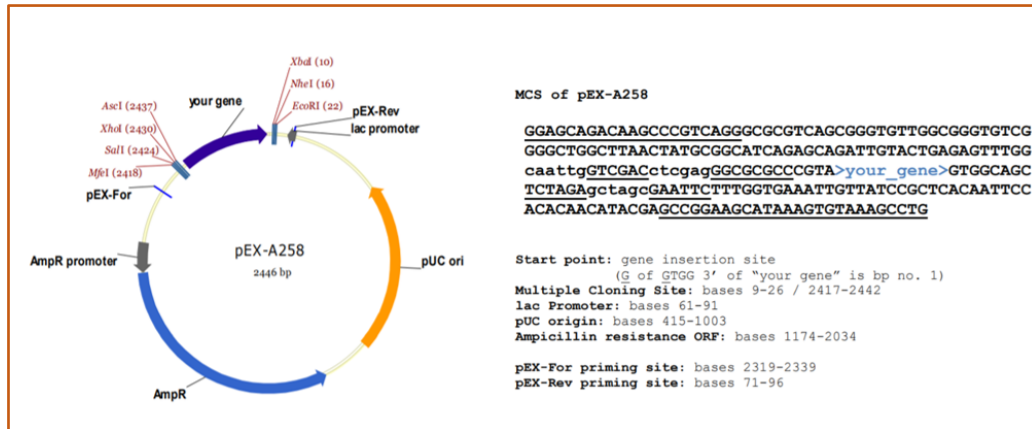


Figura 68. Vettore pEX-A258 utilizzato dall'azienda Eurofins per inserire la sequenza Donor sintetizzata.

Una volta domesticato il Donor, si è proceduto con l'assemblaggio dei costrutti di livello 1 mediante la tecnica del Golden Gate Assembly e utilizzando i vettori virali TSL “*BeYDV_TSL*” del The Sainsbury Laboratory (UK), forniti dal CREA-GB di Roma. La verifica del clonaggio delle sequenze che vanno a costituire il Livello 1 è avvenuta mediante PCR (Fig.69).

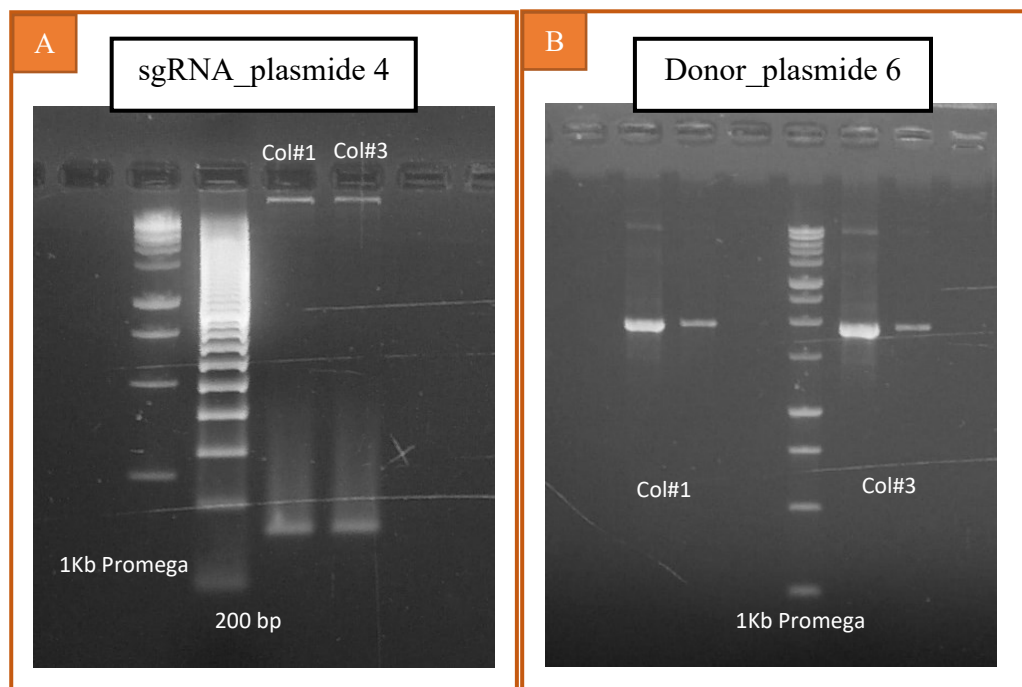
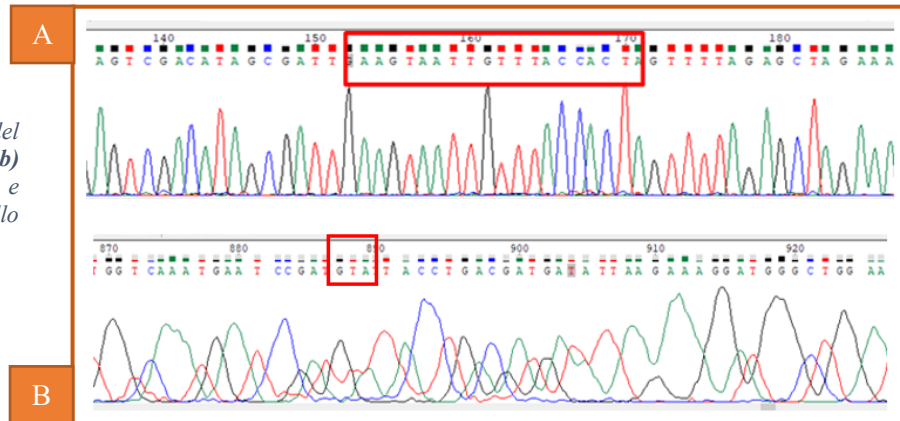


Figura 69. a) Verifica della presenza del sgRNA dopo Golden Gate Assembly; b) Verifica della sequenza Donor domesticata dopo clonaggio all'interno del plasmide 4.

Figura 70. a) Sequenziamento del target del sgRNA; **b)** Sequenziamento del Donor e verifica della presenza dello SNP²⁸⁷⁸ (GAT di *S.pennellii*).



Un'ulteriore verifica dei costrutti generati mediante Golden Gate Assembly è stata condotta facendo sequenziare il sgRNA, verificando la presenza della sequenza target, e il Donor, per accertare la presenza dello SNP²⁸⁷⁸ all'interno della sequenza (Fig.70).

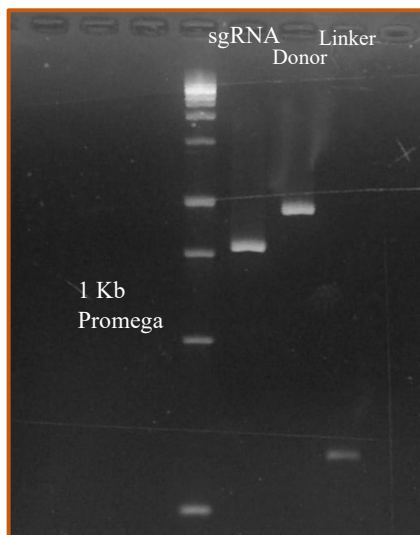


Figura 71. Amplificazione degli inserti di Livello 1.

Costrutti	Concentrazione ($\lambda=260$ nm)
Plasmide 4_sgRNA	102,3 ng/ μ L
Plasmide 6_Donor	209 ng/ μ L
Plasmide 8_Linker	82,7 ng/ μ L

Tabella 24. Concentrazione misurata al Nanodrop dei tre plasmidi di Livello 1.

Al termine delle verifiche, si è potuto procedere con l'assemblaggio di tutte le sequenze geniche che compongono il Livello 1 all'interno del Vettore Accettore sempre mediante Golden Gate Assembly e andando così a comporre il costrutto finale del *Livello 2* (Fig.72).

Il Vettore Accettore è un costrutto di grandi dimensioni, 16193bp (Fig.73), e la verifica del corretto assemblaggio è stata effettuata anche in questo caso mediante PCR condotta con una coppia di primers specifici: il primer forward si lega internamente alla sequenza del DNA Donor e lega internamente il Tnos, mentre il primer reverse è esterno al DNA Donor e legare la sequenza RB (“Right border”).

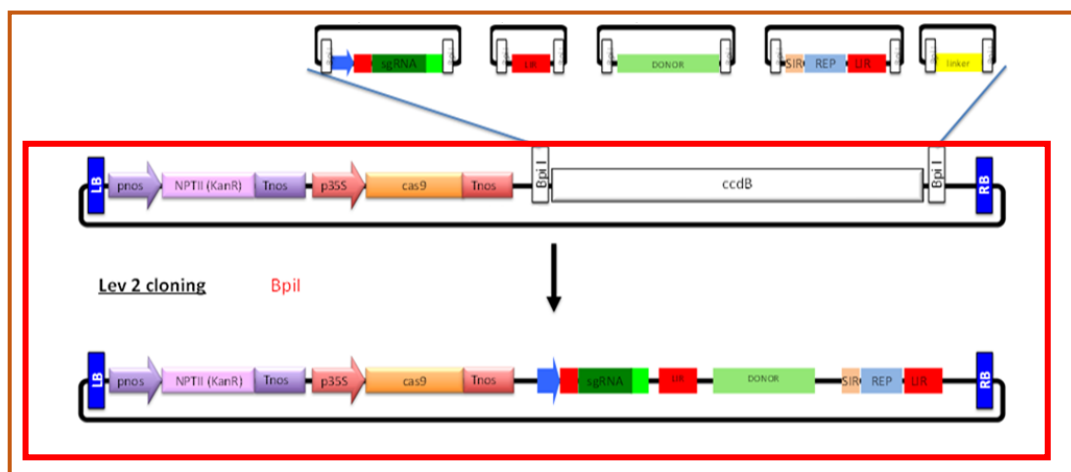


Figura 72. Clonaggio di Livello 2 con assemblaggio finale del Vettore Accettore.

Il costrutto validato (Fig.73) è stato inserito nei ceppi AGL1 e LBA4404 di *A. tumefaciens* per gli esperimenti di trasformazione delle cultivar scelte e la stabilità del costrutto virale dopo trasformazione dei ceppi di *A. tumefaciens* è

stata confermata all'inizio di ogni esperimento di trasformazione mediante PCR utilizzando come primer forward il Rep_Lir, che riconosce una sequenza all'interno dei geni omonimi, e come primer reverse l'RB che lega una sequenza presente all'interno del frammento RB.

Questa verifica è importante poiché serve per accertare l'assenza di ricombinazione del virus come anche la presenza di tutti i geni virali inseriti e del Donor.

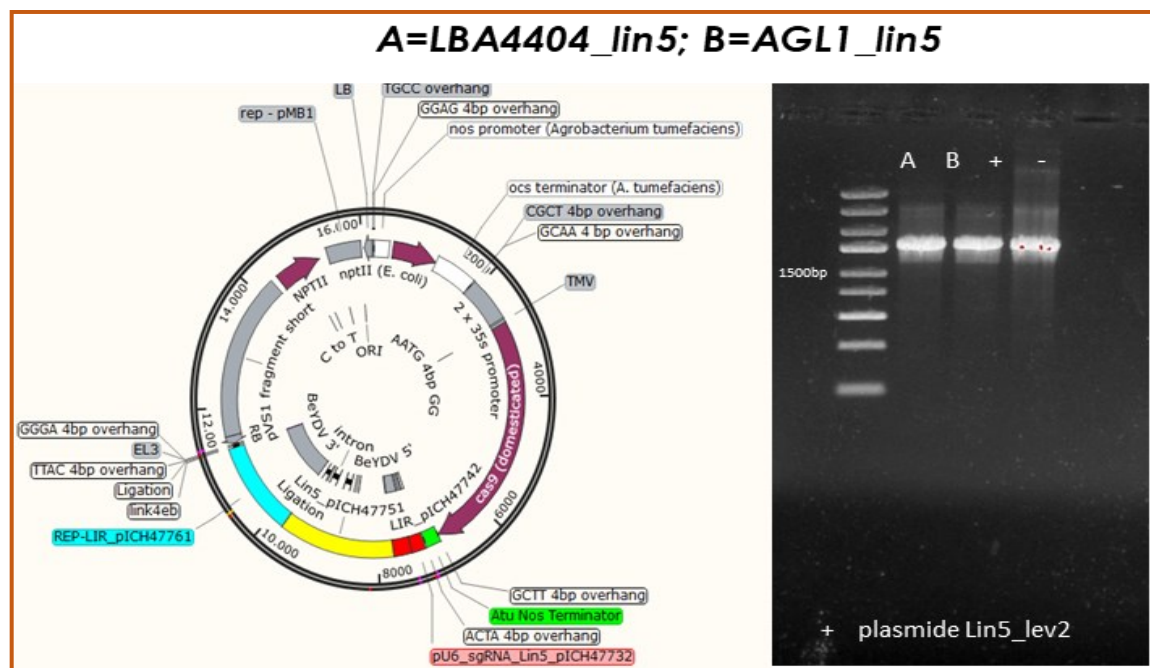


Figura 73. a) Struttura del Vettore Accettore; b) Amplificazione mediante primers forward Rep_Lir e reverse RB

L'analisi mediante PCR ha evidenziato la presenza dei geni virali nel costrutto estratto dalle cellule batteriche, confermando la stabilità del plasmide inserito e l'assenza di ricombinazione, come anche la presenza del Donor.

Non si può escludere il riarrangiamento delle copie del plasmide, ma si può sostenere che almeno parte delle copie siano integre.

L'efficienza della guida è stata valutata attraverso il *sistema Hairy roots*, dunque infettando il genotipo CREA-SAAB con *Agrobacterium rhizogenes* trasformato con un plasmide ingegnerizzato con geni virali fondamentali per la replicazione e il Donor.

Sono state ottenute 41 radici (Fig.74) derivanti da eventi di trasformazione indipendenti e sono state genotipizzate tre radici trasformate e una di controllo al fine di verificare l'avvenuta ricombinazione omologa. La sequenza ottenuta da una radice trasformata mostra il taglio della Cas9, a conferma dell'efficienza della guida ma non il "replacement", dunque l'inserzione della sequenza Donor, e, quindi, la presenza dello SNP²⁸⁷⁸.



Figura 74. Espianti infettati con A.rhizogenes per verificare l'efficienza dell'RNA guida.

L'analisi condotta mediante PCR effettuata con kit Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific) del DNA estratto da tutte le Hairy Roots ottenute conferma la replicazione virale in pianta, in tabella 25 è riportato il numero di radici ottenuto e la *percentuale di trasformazione*.

Costrutto	N° di espianti infettati	N° hairy roots	% di trasformazione	PCR Cas9 positive
LIN5	236	81	34,32	31
Empty	30	30	100	3

*Tabella 25. Numero di espianti infettati con *A.rhizogenes* e numero di radici prodotte con relativa percentuale di trasformazione e risultati della validazione mediante PCR.*

Gli *esperimenti di trasformazione* di espianti di cotiledoni dei genotipi scelti dopo prove di rigenerazione, cioè CREA-SAAB, Ailsa Craig e L.276, sono stati infettati con i ceppi AGL1 e LBA4404 di *A.tumefaciens* trasformati con il costrutto assemblato dopo tutte queste prove.

Come controllo è stato utilizzato il costrutto “empty”, cioè il vettore accettore contenente solo il gene per la resistenza alla Kanamicina e non la sequenza Donor.

Il ceppo **LBA4404_LIN5** è stato impiegato per infettare 334 espianti cotiledonari di CRA-SAAB e 195 di Ailsa Craig, ma da nessun genotipo sono stati ottenuti germogli e quindi piante T0, mentre i risultati ottenuti dagli esperimenti di Gene Editing mediante il ceppo **AGL1_LIN5** sono riportati in tabella 26 e fig. 75.

La percentuale di espianti che hanno prodotto germogli putativamente editati è risultata più alta per la linea L.276, mentre il genotipo CREA-SAAB ha prodotto il più alto numero di piante T0 dai germogli cresciuti su terreno selettivo.

Il 100 % delle piante T0 ottenute dai genotipi Ailsa e L.276 sono risultate Cas9 positive dopo verifica mediante PCR, mentre per la cultivar CREA-SAAB la percentuale di piante T0 Cas9 positive è del 67% (Tab.26). Il CREA-SAAB infettato con il costrutto “empty” ha prodotto la percentuale più alta di germogli su terreno selettivo (37) e dai germogli ottenuti sono state allevate solo 2 piante che sono ovviamente risultate Cas9 negative all’analisi PCR.

Genotipo	N° di espianti	N° di germogli	% di trasformazione	N° piante T0	N° piante T0 Cas9 positive	% eventi di editing
CRA-SAAB	465	44	9,5	6	4	67
Ailsa Craig	114	20	17,5	5	5	100
L. 276	156	31	19,9	5	5	100
Empty	100	37	37,0	2	0	0

Tabella 26. Numero di espianti infettati con AGL1_LIN5 numero di germogli e di piante T0 ottenute.



Figura 75. Germogli e piante radicate T0 ottenute a seguito dell’infezione dell’impiego del costrutto AGL1_LIN5.

L’analisi fenotipica e genotipica delle piante T0 è stata effettuata a seguito di un fenomeno manifestato dalle piante T0, Cas9 positive, già nelle fasi di

crescita *in vitro*, che consiste nella presenza a livello fogliare di un essudato cristallino di natura zuccherina, prontamente solubile in acqua.



Figura 76. Piante T0 Cas9 positive presentanti essudato zuccherino a livello fogliare.

L'analisi mediante PCR delle piante con tale manifestazione fenotipica ha evidenziato la presenza della Cas9 e per il genotipo Ailsa il DNA è stato estratto ed amplificato sia dalle foglie che presentavano essudato sia da una foglia priva di essudato ed entrambi i campioni sono risultati positivi per la Cas9 (Fig.77).

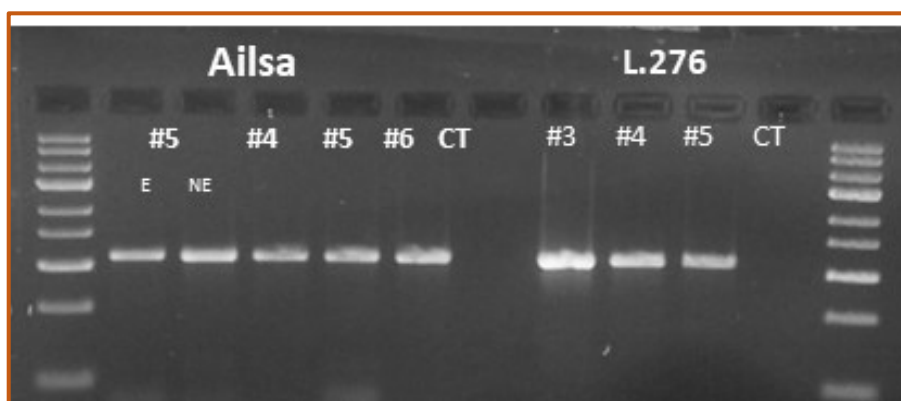


Figura 77. Analisi PCR di alcuni eventi T0. Sono stati analizzati campioni fogliari privi di essudato (NE) e presentanti essudato zuccherino (E). CT indica il campione controllo empty vector.

Dalle foglie delle piante T0 allevate in vaso e in particolare di quelle che presentavano l'essudato *in vitro*, è stato valutato il contenuto in zuccheri totali espresso come **mg/g di peso fresco** (Fig.78).

Come si può vedere dal grafico, l'evento Ailsa#1 risulta avere un contenuto di zuccheri totale quasi doppio rispetto al controllo Ailsa CT.

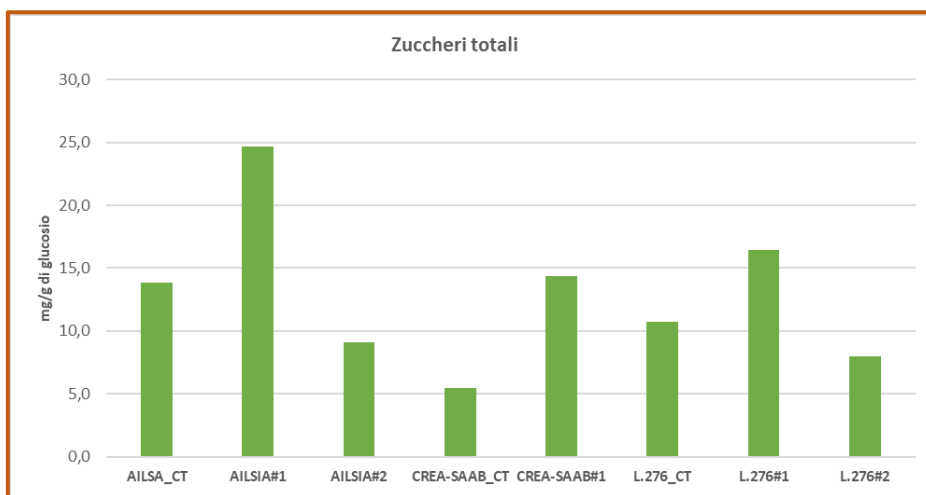


Figura 78. Contenuto in zuccheri totali in foglie di pomodoro editato con costrutto *AGL1_LIN5* e controllo (CT).

Le piante T0 radicate *in vitro* sono state acclimatate in vaso su torba e allevate in condizioni controllate in camera di acclimatamento. Su tutte le piante allevate è stata ripetuta l'analisi PCR per la Cas9 e il DNA estratto dalle giovani foglie è stato sequenziato al fine di verificare la presenza dello SNP²⁸⁷⁸ e quindi dell'avvenuto "replacement" con la sequenza Donor. L'analisi delle sequenze ha evidenziato l'assenza dello SNP desiderato pertanto il replacement del DONOR non è avvenuto in nessuna delle piante T0 ottenute (Fig.79).

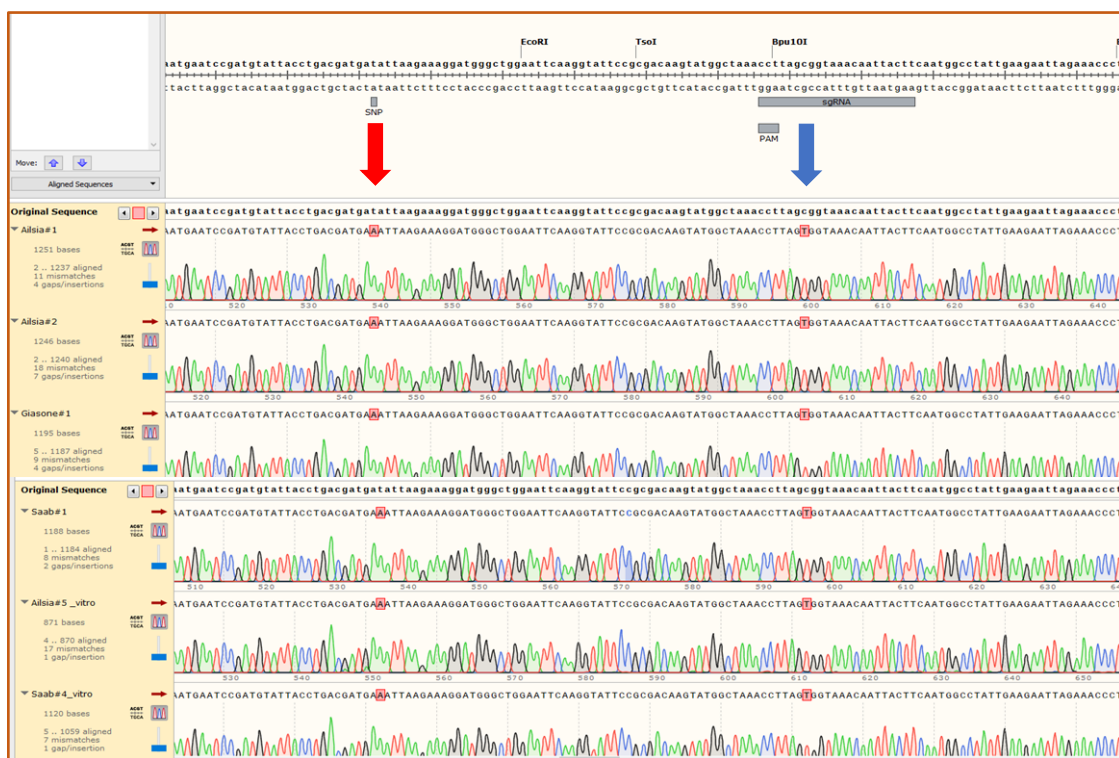


Figura 79. Allineamento delle sequenze delle piante T0 con la sequenza di controllo. La freccia rossa indica la posizione dello SNP, mentre quella blu indica la mutazione sinonima inserita nella sequenza (sostituzione con una T) al fine di proteggere la sequenza Donor dalla digestione della Cas.

Le sequenze hanno tuttavia evidenziato la presenza di doppi picchi in posizione downstream rispetto allo SNP²⁸⁷⁸ e in prossimità della gRNA, particolarmente evidenti nella sequenza dell'evento Ailsa#5 (Fig.80). Questo risultato merita particolari approfondimenti in quanto l'evento Ailsa#5 presentava nelle foglie della piantina allevata *in vitro* l'essudato zuccherino. La presenza dei doppi picchi oltre a dimostrare l'attività di taglio e, quindi, di editing della Cas9, permette di ipotizzare la condizione di eterozigosi della sequenza e la sua natura multiallelica.

La genotipizzazione e fenotipizzazione delle piante T1 è pertanto di fondamentale importanza per la validazione del risultato ottenuto al fine di

trovare l'eventuale presenza dello SNP e di altre mutazioni a livello del gene LIN5 in grado di spiegare la comparsa dell'essudato e del fenotipo mutato.



Figura 80. Doppi picchi presenti nella sequenza dell'evento Ailsa#5 a valle dello SNP²⁸⁷⁸.

Dai frutti delle piante T0 allevate in vaso in ambiente controllato sono stati estratti i semi T1.

L'analisi delle sequenze ha permesso di scegliere gli eventi T0 ottenuti meritevoli di ulteriori approfondimenti. Sulla base delle manifestazioni fenotipiche osservate e dall'analisi delle sequenze di DNA, sono stati selezionati gli eventi **Ailsa#5**, **CREA-SAAB#3** e **L.276#1** al fine della fenotipizzazione delle piante T1.

Di ogni evento sono stati seminati in vaso 30 semi T1 provenienti da frutti diversi e le piante T1 che si otterranno verranno fenotipizzate al fine di verificare la presenza di variazioni di caratteri correlati alla mutazione a carico

del gene LIN5 quali lo sviluppo della pianta, la fioritura, la produzione oltre che il grado Brix.

Dai giovani frutti, invece, si procederà con l'estrazione dell'RNA per valutare l'espressione del gene LIN5 negli eventi e nelle piante di controllo. Da ogni pianta ottenuta è stato prelevato il materiale per le analisi molecolari relative alla Cas9 e allo SNP di riferimento.

5. DISCUSSIONE

Il pomodoro (*Solanum lycopersicum*) è una delle colture ortive più importanti al mondo che, a seconda della destinazione commerciale, viene utilizzato sia come prodotto fresco che come prodotto trasformato per la produzione di pelati, concentrati e succhi.

Il miglioramento genetico del pomodoro ha obiettivi diversi in accordo alle “destinazioni” del prodotto (da mensa o da industria) ed ai diversi sistemi di coltivazione.

Una delle principali sfide del miglioramento genetico del pomodoro è l'aumento della qualità del frutto.

Fra i numerosi parametri qualitativi assume grande importanza il contenuto in solidi solubili totali, o *grado Brix*, determinato principalmente da glucosio e fruttosio. Un elevato grado Brix, infatti, è sinonimo di un più alto valore commerciale del pomodoro dovuto anche all'incremento del contenuto in sostanze aromatiche, ad un migliore contenuto vitaminico e alla maggiore shelf-life del prodotto, pertanto un grande interesse ruota intorno all'identificazione e caratterizzazione di questo tratto qualitativo, alla sua natura genetica e alla possibilità di costituire varietà commerciali di pomodoro con un elevato contenuto in solidi solubili (Fridman *et al.*, 2000, 2002, 2004; Baxter *et al.*, 2005; Zanor *et al.*, 2009).

La natura poligenica e la grande influenza dell'ambiente unitamente alle relazioni pleiotropiche con altri caratteri rendono i programmi di breeding per il grado Brix di difficile realizzazione (Fridman et al., 2002). Molte specie selvatiche di pomodoro sono state impiegate per la costituzione di linee di introgressione (IL) in cui la variabilità degli alleli selvatici è stata reintrodotta nella varietà coltivata attraverso la sostituzione di singoli segmenti cromosomici che rendono tali linee di grande utilità per l'identificazione ed il mappaggio di geni e/o QTL (Zamir, 2001; Giovannoni, 2006).

Il *Solanum chmielewskii*, originario del Perù e noto proprio per il suo alto valore di grado Brix, ha permesso l'introgressione del carattere in varietà coltivate determinando l'innalzamento del contenuto in solidi solubili (Rick 1974; Tanksley and Hewitt, 1988).

Le linee di introgressione (IL) di *S. pennellii* sono state molto utilizzate per lo studio delle basi ereditarie di caratteri agronomici (Eshed & Zamir, 1995; Eshed et al., 1996), per mappare geni e QTL, per la quantificazione dei carotenoidi e per il colore dei frutti (Liu et al., 2003), per il peso dei frutti e la composizione in zuccheri ed acidi organici (Causse et al., 2004), per il contenuto in composti antiossidanti (Rousseaux et al., 2005) e dell'acido ascorbico (Di Matteo et al., 2010) ed altri metaboliti (Schauer et al., 2006).

Linee di introgressione tra la varietà commerciale M82 di *Solanum lycopersicum* e l'accessione LA716 di *Solanum pennellii* hanno permesso di caratterizzare e mappare il QTL Brix9-2-5 all'interno del gene LIN5 che codifica per l'invertasi apoplastica, espressa esclusivamente nei fiori e nei frutti (Fridman *et al.*, 2000, 2002, 2004).

Le invertasi sono enzimi specifici per il legame β -D-fruttofuranosidico e catalizzano la reazione di idrolisi del saccarosio nei suoi due esosi D(+)glucosio e il D(-) fruttosio.

I frutti del *Solanum pennellii* sono caratterizzati da un elevato grado Brix rispetto alle varietà coltivate poiché il gene LIN5 proprio del *Solanum pennellii* presenta singole sostituzioni nucleotidiche in una regione di 484 bp nell'intervallo tra il terzo esone e il terzo introne (Fridman *et al.*, 2000; 2004; Zanol *et al.*, 2009). Studi di mutagenesi sito-specifica hanno confermato che questa differenza nucleotidica conferisce una diversa affinità per il saccarosio ($K_{m\text{Saccarosio}}$), come dimostrato dai livelli di uptake dello zucchero, significativamente più alti nei frutti della linea di introgressione 9-2-5 portante l'allele LIN5 del *S. pennellii*, rispetto a quelli delle varietà coltivate (Baxter *et al.*, 2005).

L'analisi di ricombinazione delle linee di introgressione ha dimostrato che il grado Brix e l'attività enzimatica dell'invertasi sono associati all'intervallo di

484 bp nel QTL per il locus LIN5 e che le differenze dei tre amminoacidi nel terzo esone sono responsabili degli effetti del QTL e quindi della diversa attività enzimatica tra le linee isogeniche (Fridman *et al.*, 2004). Inoltre, il residuo amminoacidico acido aspartico (Asp³⁴⁸), codificato all'interno di questo intervallo e vicino al sito di legame fruttofuranosidico dell'enzima, risulta altamente specifico per il *S. pennellii* e altamente conservato sia tra i membri della famiglia genica (LIN6, LIN7, e LIN8) sia nelle invertasi di altre piante. Studi di complementazione hanno dimostrato che tale amminoacido riveste un ruolo predominante nell'aumentare l'attività dell'invertasi codificata dal gene LIN5 e indica nella mutazione puntiforme, SNP²⁸⁷⁸, il tratto quantitativo candidato che altera la $K_{mSaccarosio}$ dell'enzima determinando l'aumento del grado Brix.

La localizzazione del QTL Brix9-2-5 nella linea IL9-2-5 rappresenta, quindi, il primo passo verso la selezione di genotipi di pomodoro con un elevato contenuto in solidi solubili.

Il lavoro di tesi, svolto nell'ambito del progetto Ministeriale BIOTECH, sottoprogetto CISGET, è stato finalizzato all'introduzione dello SNP²⁸⁷⁸ del *Solanum pennellii* mediante approcci di Cisgenesi e Gene editing, in diversi genotipi di pomodoro da mensa e da industria, al fine di aumentare il contenuto in solidi solubili e quindi il grado Brix. Il punto di partenza per entrambi gli

approcci è stato, oltre che la scelta dei genotipi più adatti alla rigenerazione e quindi alla trasformazione, la conferma della presenza dello SNP²⁸⁷⁸ e in particolare della presenza della tripletta GAT, codificante per l'acido aspartico nella linea LA716 di *S. pennellii* al posto della tripletta GAA codificante per l'acido glutammico propria dei genotipi di *S. lycopersicum* utilizzati nel lavoro di tesi.

La possibilità di ottenere **piante “cisgeniche”** e **“edite”** dipende in modo sostanziale dalla capacità rigenerativa dei tessuti strettamente legata al genotipo utilizzato, per tale motivo è stata verificata l'efficienza rigenerativa su diversi substrati, cioè su differenti genotipi di pomodoro, al fine di individuare i materiali più rispondenti e i protocolli di rigenerazione e trasformazione più efficienti.

Le **“Tecnologie per l'Evoluzione Assistita” (TEA)**, termine con cui la Società Italiana di Genetica Agraria ha recentemente definito le **“New Breeding Techniques” (NBT)**, sono tecniche, in particolare Genome editing e Cisgenesi, che permettono di riprodurre i risultati dei meccanismi alla base dell'evoluzione biologica: mutazione puntuale e scambio di geni tra individui della stessa specie (Pè, 2020).

Per migliaia di anni gli agricoltori hanno selezionato le colture cercando di renderle più produttive e meno suscettibili ai patogeni, selezionando direttamente in campo le piante più performanti.

Nel corso degli ultimi tre decenni, grandi passi avanti sono stati fatti nello sviluppo di strumenti efficienti per la mutagenesi mirata nelle piante. Le prime tecniche prevedevano l'impiego dell'*Agrobacterium*, della mutagenesi chimica mediante ESM (Metansolfonato di etile) e delle radiazioni ionizzanti.

Queste tecnologie sono state sostituite da nuovi approcci biotecnologici che si basano sulla dettagliata conoscenza del genoma e della funzione dei singoli geni e, sfruttando sistemi di trasformazione genetica, si inseriscono geni esogeni (Cisgenesi) o l'intero sistema di editing (Gene editing) in grado di generare piante uguali a quelle ottenibili tramite approcci più tradizionali (incrocio o mutagenesi), ma in tempi più brevi e con una maggiore efficienza e qualità del risultato (Cattivelli, 2015).

La Cisgenesi prevede l'ottenimento di una pianta trasformata mediante l'inserimento di un gene proveniente da un'altra pianta appartenente alla stessa specie o comunque appartenente a una specie botanicamente vicina alla specie coltivata e interfertile con essa (Cattivelli, 2015). Mentre nella tecnica di trasformazione "tradizionale" il gene inserito può derivare da qualunque essere vivente (es. il mais Bt porta un gene di origine batterica), nelle piante cisgeniche

il gene deriva da una pianta affine alla specie coltivata e, almeno in linea teorica, potrebbe essere introdotto nella pianta coltivata anche attraverso il miglioramento genetico convenzionale.

A differenza della transgenesi, la cisgenesi prevede il trasferimento di uno o più geni “nativi” con le proprie sequenze regolatrici e i propri introni, e nel normale orientamento. In pomodoro la tecnica della trasformazione genetica “tradizionale” è stata ampiamente utilizzata, ad esempio, per ritardare la marcescenza (Redenbaugh K., 1992), per conferire la partenocarpia (Ficcadenti *et al.*, 1999) e per sintetizzare L-dopa, farmaco essenziale secondo l’OMS per trattare il morbo di Parkinson (Breitel *et al.*, 2021).

Questa tecnica è stata utilizzata con successo in frumento duro, patata, vite e melo per conferire resistenza a patogeni e tratti qualitativi, ma non tutti i prodotti ottenuti soddisfano completamente i requisiti delle piante cisgeniche, in quanto alcuni contengono sequenze regolatrici esogene e /o geni dei marcatori di selezione (Holme *et al.*, 2012, Cardi, 2016; Mujjassim *et al.*, 2019).

Sebbene il genoma del pomodoro, sia di quello coltivato che di quello selvatico, sia stato completamente sequenziato e, dunque, siano disponibili numerose informazioni sulle sequenze di fondamentale importanza per l’applicazione della cisgenesi, in letteratura non sono riportati molti lavori inerenti all’impiego

di quest'ultima in pomodoro. Il lavoro di tesi svolto e i primi approcci nella preparazione dei costrutti per la cisgenesi assumono, quindi, particolare importanza (Palma *et al.*, 2019).

Le **criticità incontrate nella cisgenesi** sono dovute in particolare alla grandezza del “cisgene” da inserire (7329 e 9829 bp a seconda delle sequenze del promotore e del terminatore) e dal sistema di co-trasformazione impiegato. La grandezza dei frammenti ha reso difficile la preparazione dei costrutti, ma grazie all'impiego di polimerasi altamente performanti e di kit specifici per il clonaggio di frammenti di grandi dimensioni, è stato possibile preparare due costrutti.

Altro fattore limitante l'ottenimento delle piante cisgeniche è stato il sistema di co-trasformazione costituito dall'impiego di un unico ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* portante due plasmidi, uno contenente il gene marcatore e l'altro con il gene di interesse (Hellens *et al.*, 2000; Afolabi *et al.*, 2005).

Il sistema della co-trasformazione è semplice ed altamente efficiente e permette l'eliminazione del gene marcatore dal DNA genomico delle piante trasformate, superando le perplessità legate alla transgenesi e ai primi OGM. La preparazione del costrutto richiede, però, tempi piuttosto lunghi e l'ottenimento di piante cisgeniche dipende da eventuali associazioni tra i DNA introdotti e

dalla efficienza di trasformazione propria della specie oggetto di studio (Mujjassim *et al.*, 2019).

Nel corso della tesi è stata avviata la preparazione di nuovi costrutti, secondo un protocollo già utilizzato in patata, che prevede l'impiego di un **sistema marker-free** con **un solo plasmide** portante il cisgene di interesse e che limita la presenza di eventuali legami tra i DNA inseriti (Jo *et al.*, 2014; 2016). Seppure la necessità di analizzare tutte le piante putativamente trasformate mediante PCR, metodo lungo e costoso, e l'elevato numero di piante chimeriche che si possono ottenere rappresentino un limite, il sistema marker-free risulta attualmente l'unico metodo per l'inserimento di grandi cisgeni come nel caso del gene LIN5 oggetto della tesi.

A differenza della Cisgenesi, il Genome editing, permette la manipolazione mirata di specifiche sequenze del genoma aggiungendo, rimuovendo o sostituendo brevi tratti di DNA, solitamente una o poche basi, che saranno ereditati stabilmente e in tempi molto brevi.

Questa tecnica si basa sull'azione di nucleasi in grado operare un taglio nel DNA in punti specifici causando rotture a doppio filamento, che poi possono essere riparate mediante meccanismi cellulari endogeni quali il Non-homologous end joining (NHEJ) e l'Homology-directed repair (HDR), in

particolare per il progetto di tesi è stato scelto il sistema CRISPR/Cas9, basato sull'azione dell'endonucleasi di classe II, Cas9.

Le tecnologie del Genome editing sono state utilizzate in diverse specie vegetali di interesse agrario quali orzo (Lawrenson *et al.*, 2015), grano (Wang *et al.* 2014), riso (Zhang *et al.*, 2014), petunia (Zhang *et al.*, 2016) e cavolfiore (Lawrenson *et al.*, 2015). In pomodoro è stato utilizzato con successo per indurre mutazioni nel gene per l'antocianina (anthocyanin mutant 1 - ANT1) (Čermák *et al.* 2015), per il locus RIN responsabile della maturazione dei frutti (Ito *et al.*, 2015), per il gene PROCERA (PRO) responsabile della inibizione della via metabolica delle giberelline (Lor *et al.*, 2014) e per l'omologo del gene ARGONAUTE7 (SIAGO7) di *Arabidopsis* (Brooks *et al.*, 2014) e per studiare la funzione dei geni che determinano la differenziazione radicale (Ron *et al.*, 2014).

È stato visto che la via della Ricombinazione omologa, sebbene fattibile, non è ancora un metodo di routine a causa della bassa frequenza di eventi di editing. Diversi approcci sono stati sviluppati nel corso degli anni per aumentare la frequenza dell'HR tra un bersaglio genomico e un donatore omologo extracromosomico.

Tra questi l'impiego di vettori virali (Shen e Hohn, 1994) e in particolare il Geminivirus *Bean yellow dwarf* (BeYDV) (Baltes *et al.*, 2014).

In questa tesi per l'editing del gene LIN5 è stato utilizzato il sistema CRISPR/Cas9 via ricombinazione omologa mediante l'impiego del vettore geminivirus BeYDV in cui è stata clonata la sequenza di DNA Donor di 2012 bp portante lo SNP²⁸⁷⁸ desiderato.

Seppur il “gene replacement”, cioè l'introduzione dello SNP nella sequenza target, non sia avvenuta, le piante T0 ottenute possono essere comunque considerate eventi di editing in quanto la Cas9 ha comunque introdotto dei tagli, come dimostrato dalla presenza di doppi picchi nel sequenziamento, dopo lo SNP di interesse e nella zona del gRNA nelle sequenze del DNA estratto dalle stesse.

Le piante T0, sia *in vitro* che in vaso, hanno manifestato delle alterazioni fenotipiche associate allo sviluppo vegetativo della pianta e alla struttura dei fiori e del fusto, nonché l'aumento del grado Brix nei frutti. Il contenuto in solidi solubili totali è strettamente associato all'attività dell'invertasi codificata dal gene LIN5, infatti il suo silenziamento determina una diminuzione lineare di questo importante parametro qualitativo del pomodoro (Zanor *et al.*, 2009).

Il contenuto di zucchero, lo sviluppo dei frutti, la fertilità e, soprattutto, la regolazione dei livelli ormonali sono tratti interconnessi tra loro, come diversi studi presenti in letteratura suggeriscono, infatti, l'attività dell'invertasi apoplastica svolge un ruolo chiave in vari aspetti dello sviluppo del frutto, quali

il tasso di allegagione, la dimensione dei frutti, la fertilità e la produttività della pianta (Zanor *et al.*, 2009).

In tabacco e in mais, il silenziamento dell'invertasi apoplastica provoca nelle antere la sterilità della pianta, mentre è stato visto che l'mRNA codificato dal LIN5 è presente nei frutti verdi, rossi e nei fiori con livelli di espressione più alti nel gineceo e più bassi negli stami (Godt e Roitsch, 1997). Pertanto, si pensa che alterazioni nell'espressione di questo gene possano portare a modificazioni, oltre che del grado Brix, anche di altri caratteri morfologici, agronomici e qualitativi del pomodoro.

Dalle piante T0, che hanno presentato evidenti alterazioni morfologiche oltre che un elevato contenuto in solidi solubili nei frutti, sono stati raccolti i semi che sono stati posti a germinare in vaso in ambiente controllato. In particolare, le piante T1 di 3 eventi T0, uno per ogni genotipo di pomodoro utilizzato (Ailsa, L.276, CREA-SAAB), sono tuttora in corso di valutazione fenotipica (rilievo dei caratteri morfologici e qualitativi), genotipica (sequenziamento del DNA) e molecolare (analisi PCR). Le piante T1, seppur mancanti dello SNP²⁸⁷⁸ desiderato, presentano evidenti mutazioni morfologiche, agronomiche e qualitative che saranno ulteriormente analizzate nella generazione T2.

6. CONCLUSIONI

I metodi di miglioramento genetico convenzionale sono laboriosi, richiedono molto tempo e caratteri indesiderati vengono spesso trasferiti insieme ai tratti desiderati, fenomeno che si osserva frequentemente quando si utilizzano parentali selvatici.

L'innovazione nel miglioramento genetico delle varietà di specie coltivate ad uso alimentare è necessaria per far fronte alle sfide dei cambiamenti globali, come la crescita della popolazione e il cambiamento climatico. Sebbene la tecnologia transgenica possa essere utilizzata per modificare l'espressione di particolari geni, l'accettazione pubblica delle piante geneticamente modificate è ancora molto bassa.

Lo sviluppo delle nuove tecnologie TEA, ha portato all'implementazione di procedure di breeding cisgenico e intragenico, e di editing genomico per la costituzione di varietà aventi uno o pochi caratteri migliorati.

Queste tecnologie consentono una più precisa caratterizzazione e una più efficiente utilizzazione delle risorse genetiche vegetali, come anche un'accelerazione nello sviluppo di nuove varietà e pertanto rappresentano uno strumento importante, se non determinante, per l'agricoltura italiana.

Il lavoro di tesi ha permesso di confermare la validità degli approcci di cisgenesi e del gene editing utilizzati nell'aumentare il contenuto in solidi solubili in genotipi di pomodoro.

Il grado Brix, o contenuto di Solidi Solubili, è uno dei principali parametri qualitativi, determinato principalmente dal contenuto in glucosio e fruttosio.

L'ottenimento di varietà di *Solanum lycopersicum*, destinate sia al mercato fresco sia all'industria aventi un elevato grado Brix rappresenta un risultato di grande importanza sia dal punto di vista economico, in quanto aumenta il valore commerciale del prodotto, sia qualitativo.

L'elevato grado Brix è, infatti, anche espressione di un alto contenuto in sostanze aromatiche, di un migliore contenuto vitaminico e di una maggiore conservabilità del prodotto. L'impiego di tipologie di pomodoro espressione del territorio e della tipicità italiana rappresenta inoltre un valore aggiunto di fondamentale importanza sia per il miglioramento genetico sia per la valorizzazione del germoplasma italiano di pomodoro.

7. BIBLIOGRAFIA

Afolabi A.S., Worland B., Snape J., Vain P. – Novel pGreen/pSoup dual-binary vector system in multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oriza sativa* L) plant, African Journal Biotechnology, Vol.4, pp.531-540, June **2005**

Bai Y. – Developments in tomato breeding: conventional and biotechnology tools. In A. Mattoo (Ed.), *Achieving sustainable cultivation of tomatoes* (pp. 187-202), **2017**, Burleigh Dodds Science Publishing Limited. <http://10.19103/as.2016.0007.08>

Baltes, N.J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P.A. and Voytas, D.F. – DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell*, 26, 151– 163, **2014**

Barcaccia G., Lucchin M. – Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico, **2016**, Seme n.2/16

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. – CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes, *Science*, Vol. 315, 23 MARCH **2007**

Bauchet G. and Causse, M. – Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its wild relatives, InTechOpen, pp. 133–162, **2012**

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

Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, Patron NJ, Nekraso V. – Editing plant genomes with CRISPR/Cas9, *Current Opinion in Biotechnology*, 32:76–84, **2015**

Bin Zhang B., Yang X., Yang C., Li M., Guo Y. – Exploiting the CRISPR/Cas9 System for Targeted Genome Mutagenesis in *Petunia*, *Sci. Rep.*, 6, 20315; **2016**, doi: 10.1038/srep20315

Bohn G.W., Tucker C.M. – Studies on *Fusarium* wilt of the tomato. I. Immunity in *Lycopersicon pimpinellifolium* Mill, and its inheritance in hybrids, *Research Bulletin. Missouri Agricultural Experiment Station*, No.311, **1940**

Bolger A., Scossa F., Bolger M. E., Lanz C., Maumus F., Takayuki Tohge³ et al. – The genome of the stress-tolerant wild tomato species *Solanum pennellii*, **2014**, Vol. 46, Num. 9, Nature Genetics

Breitel D., Brett P., Alseekh S., Fernie A.R., Butelli E., Martin C. – Metabolic engineering of tomato fruit enriched in L-DOPA, Metabolic Engineering, 65:185-196, **2021**

Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B., Van Eck J. – Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system, Plant Physiol, 166, 1292–1297, doi: 10.1104/ pp.114.247577, **2014**

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

Cardi, T. – Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding, *Plant Breeding*, 135, 139–147, **2016**

Castellari L. (Centro di Assistenza Tecnologica Produzioni Vegetali, Catev) – I caratteri della qualità, *Il Divulgatore “Pianeta pesca Qualità e sicurezza per il consumatore”*, n.3-4/**2002**

Cattivelli L. – GM e dintorni: non si ferma il miglioramento genetico, *L’informatore Agrario* 44:16-18, **2015**

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

Cheema D.S, Dhaliwal M.S. – Hybrid Tomato Breeding, **2005**, Department of Vegetable Crops, Punjab Agricultural University, Ludhiana, 141004, India, *Journal of New Seeds*

Čermák T., Nicholas J. Baltes, Radim Čegan, Yong Zhang and Daniel F. Voytas. – High-frequency, precise modification of the tomato genome, *Genome Biology*, **2015**, DOI 10.1186/s13059-015-0796-9

Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordont M.P., Nester E.W. – Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis, *Cell*, Vol. 11, 263-271, June **1977**

Chitovsky V., De Vos G., Zambryski P. – Single-stranded DNA binding protein encoded by the VirE2 locus of *Agrobacterium tumefaciens*, *Science* 240:501-504, **1988**

Comitato Nazionale per la Biosicurezza, le Biotecnologie e le Scienze della Vita – Le New Breeding Techniques (NBT): la posizione dei principali portatori d'interesse italiani, 17 luglio **2017**

D. Daprà – Principali composti funzionali del pomodoro da industria: metodi analitici e applicazione, tesi.cab.unipd.it

Dahan-Meir T., Filler-Hayut S., Melamed-Bessudo C., Bocobza S., Czosnek H., Aharoni A., Levy – Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system, *The Plant Journal*, 95:5–16, **2018**

Damania A. – History, achievements, and current status of genetic resources conservation. *Agron J* 100: 9-21, **2008**

Davies J, Hobson G. – The constituents of tomato fruit - The influence of environment, nutrition and genotype, *Crit Rev Food Sci Nutr* 15: 205-280, **1981**

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

Dondarini R., Dondini M. (2010) *Il pomodoro; storia e arte. – Coltura e cultura*, ART Servizi Edito-riali S.r.l. Pag: 18 – 38

Ellul P., Garcia-Sogo B., Pineda B., Rios G., Roig L.A., Moreno V. – The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L.Mill.) is genotype and procedure dependent, *Theor Appl Genet* (**2003**) 106:231–238

Escobar M.A. and Dandekar A.M. – *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease, TRENDS in Plant Science, Vol.8, N.8, August **2003**

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

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

Eshed Y. and Zamir D. – Less-Than-Additive Epistatic Interactions of Quantitative Trait Loci in Tomato, The Genetics Society of America, **1996**

European Commission – COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT: Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16, 29 April **2021**

Federazione Italiana Scienze della Vita (FISV - Barilà D., Cereseto A., Morandini P., Pichierri M.M. P., Poli V., Russo A., Tofanelli S.) – L’editing del genoma e il sistema CRISPR/Cas9, a cura del Gruppo di Lavoro FISV “Nuove tecnologie e scienze della vita”

Ficcadenti N., Sestili S., Pandolfini T., Cirillo C., Rotino G.L., Spena A. – Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato, *Molecular Breeding* 5:463-470, **1999**

Fillatti J.J., Kiser John, Rose R, e Comai L. – Efficient transfer of a glyphosate tolerance into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector, **1987**, *Nature*

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

Fridman E., Pleban T, Zamir D. – A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene, *PNAS*, vol. 97 u no. 9, 4718–4723, 25 April **2000**

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

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

George E.F. – Plant propagation by tissue culture, Part 2- in practice. 2nd ed. Exegetics, Edington, **1996**

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

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

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

Grandillo S. Mustilli A.C., Parisi M., Morelli G., Giordano I. Bowler C. – Tecniche avanzate per la valutazione qualitativa del pomodoro: il caso Campania. Agroindustria, 3(2): 151-159, **2004**

Grandillo S., Chetelat R., Knapp S., Spooner D., Peralta I., Cammareri M., Perez O., Termolino P., Tripodi P., Chiusano M.L., Ercolano M.R., Frusciante L., Monti L., Pignone D. – Solanum sect. Lycopersicon, Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, pp 129-215, **2011**

Hellens P.R. Edwards E.A., Leyland N.R., Samantha B., Mullineaux P.M. – A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation, *Plant Molecular Biology*, 42:819-832, **2000**

Hille C. and Charpentier E. – CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 371: 20150496, **2016**

Holme, I. B., Dionisio G., Brinch-Pedersen H., Wendt T., Madsen C. K., Vincze E. and Holm P. B. – Cisgenic barley with improved phytase activity, *Plant. Biotechnol. J.*, 10, 237—247, **2012**

Ito, Y., Nishizawa-Yokoi, A., Endo, M., Mikami, M. & Toki, S. – CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 76–82, doi: 10.1016/j.bbrc.2015.09.117, **2015**

Javanmardi J., Kubota C. – Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage, *Postharvest Biology and Technology* 41, **2006**, 151–155

Jiang D. and Doudna J. A. – CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms, *Annual Review of Biophysics*, 46: 505–529, **2017**

Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. –A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337:816-821, **2012**

Jo K. R., Kim C. J., Kim S. J., Kim T. Y., Bergervoet M., Jongsma M. A., Visser R. G., Jacobsen E., and Vossen J. H. – Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking, *BMC Biotechnol.*, 14, 50, **2014**

Jo K.R., Zhu S., Bai Y., Hutten R.C.B., Kessel G.J.T., Vieshouwers G.A.A., Visser R.G.F., Vossen J.H. – Problematic crops: 1. Potatoes: Towards sustainable potato late blight resistance by cisgenic R gene pyramiding. Chapter 9, In: *Plant pathogen resistance biotechnology*, ed. By Collinge D.B., published by John Wiley & Sons Inc., **2016**

Kesara Anamthawat-Jónsson – Molecular cytogenetics of introgressive hybridization in plants, Department of Biology, University of Iceland,

Grensdsvégi 12, Reykja vik 108, Iceland, *Methods in Cell Science* 23: 139-148
(2001)

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

Lee L.Y., Gelvin S.B. – T-DNA Binary Vectors and Systems, *Plant Physiology*,
February **2008**, Vol.146, pp.325-332

Ladizinsky G. – *Plant Evolution under Domestication*. Kluwer Academic,
Londres, **1998**

Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy
C., Harwood W. – Induction of targeted, heritable mutations in barley and
Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease, *Genome Biology*, **2015**.
DOI 10.1186/s13059-015-0826-7

Leonie C. Moyle – Ecological and evolutionary genomics in the wild tomatoes (Solanum sect, Lycopersicon), **2008**, Department of Biology, Indiana University, Bloomington, Indiana 474051

Lippman Z. B., Semel Y., Zamir D. – An integrated view of quantitative trait variation using tomato interspecific introgression lines. *Curr Opin Genetics & Dev.*, **2007** *17*, 545-552

Liu, L., Saunders, K., Thomas, C.L., Davies, J.W. and Stanley, J. – Bean yellow dwarf virus RepA, but not Rep, binds to maize retinoblastoma protein, and the virus tolerates mutations in the consensus binding motif. *Virology*, *256*, 270–279, **1999**

Liu J., Cong B., and Tanksley S.D. – Generation and analysis of an artificial gene dosage series in tomato to study the mechanisms by which the cloned quantitative trait locus fw2.2 controls fruit size, *Plant Physiol.*, *132*, 292–299, **2003**

Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., Weiss D., Olszewski N.E. – Targeted Mutagenesis of the Tomato PROCERA Gene Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases, *Plant Physiology*, 166: 1288–1291, **2014**

Lusser M., Parisi C., Plan D, Cerezo E. R. – Deployment of new biotechnologies in plant breeding, *Nature biotechnology*, Volume 30, Num. 3, march **2012**

Mazzucato A., Papa R., Bitocchi E., Mosconi P., Nanni L., Negri V., Picarella M. E., Siligato F., Soressi G.P., Tiranti B., Veronesi F. – Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces, *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 116, pag. 657–669, **2008**

McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R. – Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L.esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens*, **1986**, *Plant Cell Repost*, 81-84

Monforte A.J., Friedman E., Zamir D., Tanksley S.D. Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: deductions about natural

variation and implications for germplasm utilization, *Theor Appl Genet*, 102:572–590, **2001**

Monti L. – La genomica per la valorizzazione dell’agrobiodiversità, *Memorie di Scienze Fisiche e Naturali* 126°, **2008**, Vol. XXXII, P. II, pp. 7-30

Monti L., Barone A. – La genomica per la valorizzazione della filiera del pomodoro, **2010**, Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell’Ambiente e delle Produzioni Animali, Università di Napoli “Federico II”

Mujjassim N.E, Mallik M, Rathod NKK., Nitesh SD. – Cisgenesis and intragenesis a new tool for conventional plant breeding: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1): 2485-2489, **2019**

Palma D., Sestili S., Nicolìa A., D’Agostino N., Cardi T. – Agro-vector development in tomato to increase solid soluble content via cisgenesis. *Proceedings of the LXIII SIGA Annual Congress Napoli, Italy – 10/13 September 2019*, ISBN 978-88-904570-9-8, p. 8.11

Paradossi, A., G. Prosdocimi Gianquinto, P. Santamaria, e L. Incrocci.
Orticoltura. Principi e pratica. Milano: Edagricole, **2018**

Paran I., Knaap van der E. – Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper, *J Exp Bot*, 58(14):3841-3852, **2007**

Paterson A.H., DeVerna J.W., Lanini B., Tanksley S.D – Fine Mapping of Quantitative Trait Loci Using Selected Overlapping Recombinant Chromosomes, in an Interspecies Cross of Tomato, *Genetics* 124: 795-742, March **1990**

Pè M.E. – Nelle tecnologie per l'evoluzione assistita il futuro dell'agricoltura, *L'informatore Agrario* 20:5, **2020**

Peleman J.D., van der Voort J.R. – The challenges in Marker Assisted Breeding, *Eucarpia Leafy Vegetables*, **2003**

Peralta, I. E., and D. M. Spooner – Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* Mill. Wettst. subsection *Lycopersicon*), **2001**, *Am. J. Bot.* 88:1888–1902

Peralta, I. E., Spooner, D. M. & Knapp, S. – Taxonomy of tomatoes: a revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives

in sections Juglandifolia and Lycopersicoides, Syst. Bot. Monogr. 84, 1–186,
2008

Pirazzoli C., Palmieri A. – Il pomodoro; mercato nel mondo – Coltura e cultura,
ART Servizi Editoriali S.r.l., **2010**, Pag: 508 – 517

Puchta H. and Fauser F. – Synthetic nucleases for genome engineering in
plants: prospects for a bright future, Plant J., 78, 727–741, **2014**. doi:
10.1111/tpj.12338

Redenbaugh K. – Safety assessment of genetically engineered fruits and
vegetables: a case study of Flavr Savr tomato, CRC Press, Boca Raton, **1992**

Rete Semi Rurali – Tecniche di miglioramento genetico vegetale: una
valutazione dal punto di vista dell'agricoltura biologica, **2019**, FiBL

Rick C.M. – The Tomato, Handbook of Genetics, Springer, pp. 247-280,
1974, https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2994-7_11

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

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

Rick C. M. and Yoder J. I. – Classical and molecular genetics of tomato: highlights and perspectives, *Annual Review of Genetics*, Vol. 22, pag. 281-300, December **1988**, <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.001433>

Rick, C.M. and Chetelat, R.T. – Utilization of related wild species for tomato improvement, *Acta Hortic.*, 412, 21-38, **1995**, DOI: 10.17660/ActaHortic.1995.412.1

Rinaldo A.R., Ayliffe M., – Gene targeting and editing in crop plants: a new era of precision opportunities, *Mol. Breed.*, 35, **2015**

Robertson L.D., Labate J.A. Genetic resources of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives, *Genetic improvement of Solanaceous Crops: Tomato*, Vol.2, pag. 25-68, **2007**

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

Ron M., Kajala K., Pauluzzi G., Wang D., Reynoso M.A., Zumstein K., Garcha J., Winte S., Masson H., Inagaki S. et al. – Hairy root transformation using

Agrobacterium rhizogenes as a tool for exploring cell type-specific gene expression and function using tomato as a model, *Plant Physiol.*, 166:455-469, **2014**

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

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

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

Schaart J. G., Visser, R.G.F. – Novel plant breeding techniques-Consequences of new genetic modification-based plant breeding techniques in comparison to conventional plant breeding (Report **2009-02**, pp. 2785-2794). Bilthoven: The Netherlands Commission on Genetic Modification (COGEM)

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

Schouten H.J., Krens F.A., Jacobsen E. – Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants, *EMBO reports*, Vol.7, No.8, **2006**

Senato della Repubblica (Atto n.591, XVII Legislatura) – Affare assegnato sulle nuove tecnologie in agricoltura, con particolare riferimento all’uso delle biotecnologie sostenibili e di precisione, 4 agosto **2015**

Seyran E., Craig W. – New Breeding Techniques and Their Possible Regulation, *AgBioForum*, 21(1): 1-12, **2018**

Shen W.-H. and Hohn B. – Amplification and expression of the beta-glucuronidase gene in maize plants by vectors based on maize streak virus, *Plant J.*, 5, 227–236, **1994**

Simpson R.B., Spielmann A., Margossian L., McKnight T. D. – A disarmed binary vector from functions in *Agrobacterium rhizogenes*: frequent co-transformation of two distinct T-DNAs, *Plant Molecular Biology* (**1986**), 403-415

Skoog F. and Miller C.O. – Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11, 118-131, **1957**

Soressi G. 1969. Il pomodoro. Edagricole, Bologna, pp.45

Soressi G., Mazzucato A. – Il pomodoro; Caratteristiche botaniche – Coltura e cultura, ART Servizi Editoriali S.r.l., **2010**, Pag: 1 – 15

Soressi G., Mazzucato A. – Il pomodoro; Miglioramento genetico – Coltura e cultura, ART Servizi Editoriali S.r.l., **2010**, Pag: 392 – 407

Stanton B.G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool, *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.*, Vol. 67, n.1, p. 16-37, DOI:10.1128/MMBR.67.1.16–37.2003

Stevens MA, Kader AA, Albright-Holton M, Algazi M. – Genotypic variation for flavour and composition in fresh market tomatoes, *J. Amer Soc. Hort. Sci.*, 102(5): 680–689, **1977**

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

Tal Dahan-Meir, Shdema Filler-Hayut, Cathy Melamed-Bessudo, Samuel Bocobza, Henryk Czosnek, Asaph Aharoni, Avraham A. Levy – Efficient in planta gene targeting in tomato using geminiviral replicons and the CRISPR/Cas9 system, *The Plant Journal* (**2018**) 95, 5–16; doi: 10.1111/tpj.13932

Tanksley S.D. and Hewitt J. – Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato - a re-examination, *Theoret. Appl. Genetics* 75, 811–823, **1988**, <https://doi.org/10.1007/BF00265610>

Tanksley S., McCouch S. – Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild, *Science* 277: 1063-1066, **1997**

Terry A. Brown – *Biotechnologie molecolari: Principi e tecniche*, Seconda Edizione, Zanichelli

The Tomato Genome Consortium (2012) – The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution, NATURE Vol. 485, 635-641, <https://doi.org/10.1038/nature11119>

Thorpe T.A. – Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro, International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, University of Calgary. International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, 49-58, **1978**

Thorpe T.A. – Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro, Plant Tissue Culture, A. Fujiwara, ed., pp. 121-124, **1982**

Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., et al. – Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew, Nat. Biotech., 32:947–51, **2014**

Young N.D. – A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding, Molecular Breeding 5: 505–510, **1999**

Zaidi S.S. and Mansoor S. – Viral vectors for plant genome engineering, Frontiers in Plant Science, Article 539, Vol.8, April **2017**

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

Zanor M.I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Kuhn C., Bleiss W., Giavalisco P., Willmitzer L., Sulpice R., Zhou Y-H., Fernie A.R. – RNA Interference of LIN5 in tomato confirms its role in controlling brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility, *Plant Physiology*, 150:1204–1218, **2009**

Zhang H, Zhang J, Wei P, Zhang B, Gou F, Feng Z, Mao Y, Yang L, Zhang H, Xu N et al. – The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation, *Plant Biotechnol*, 12:797-807, **2014**

8. SITOGRAFIA

https://www.ilsole24ore.com/art/pomodori-l-industria-ripresa-anni-crisi-ADxONkKB?refresh_ce=1

<https://www.agraria.org/coltivazionierbacee/pomodoro.htm>

<https://solgenomics.net/feature/17922386/details>

<https://www.yara.it/nutrizione delle colture/pomodoro/gestione-del-gusto/>

<https://www.takarabio.com/learning-centers/cloning/primer-design-and-other-tools>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

European Union

https://ec.europa.eu/food/plant/gmo/modern_biotech/new-genomic-techniques_en

https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/gmo_mod-bio_ngt_eu-study.pdf

<https://international.neb.com/>

FAO – Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura.

<http://www.fao.org/biotech>

<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>

<http://www.fao.org/faostat>

<http://www.fao.org/faostat/en/#search/tomato%20production>

Le Scienze – edizione italiana di Scientific American

https://www.lescienze.it/news/2020/10/07/news/premio_nobel_chimica_2020_manipolazione_genetica_crispr-cas9-4812741/

https://www.lescienze.it/news/2020/01/07/news/condanna_ricercatore_cinese_editing_genetico_crispr-4654207/

Portale della Flora d'Italia

<http://dryades.units.it/floritaly/>

Valutazione della sgRNA

GT-Scan: <https://gt-scan.csiro.au/>

Cas-Designer: <http://www.rgenome.net/cas-designer/>

CRISPRdirect: <https://crispr.dbcls.jp/>