

Relazione



**Caratterizzazione genetica e biochimica
dell' ecotipo di pomodoro "Montagano"
(Comune di Montagano, Cb)**

Introduzione

L'obiettivo del presente studio è stato caratterizzare dal punto di vista genetico e biochimico l'ecotipo di pomodoro di Montagano prodotto da seme controllato (DeCo) del comune di Montagano (Cb).

Solanum lycopersicum è una specie diploide ($2n=24$) con una dimensione del genoma di circa 900 Mb. L'indagine genetica sui campioni di pomodoro Montagano è stata effettuata mediante l'impiego di SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) differenze a livello di singolo nucleotide che presentandosi con una certa frequenza nel genoma di un dato organismo consentono di differenziare varietà o addirittura individui all'interno di una stessa specie.

Gli SNPs utilizzati nella nostra analisi sono stati identificati nel genoma di Montagano con il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next Generation Sequencing). Precisamente è stato adoperato l'approccio RESTseq (RESTRiction fragment SEQuencing, Stolle et al., 20113) che prevede l'impiego di enzimi di restrizione per ridurre la complessità del genoma e l'impiego di una piattaforma NGS per l'individuazione degli SNPs.

La peculiarità della tecnica è che essa consente, contemporaneamente, di identificare SNPs ben distribuiti sull'intero genoma di un organismo di interesse senza dover procedere con il sequenziamento massivo dell'intero patrimonio genetico e di conoscere lo stato allelico (genotipizzazione) delle informazioni (SNP) prodotte.

Con l'impiego della cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) è stato invece determinato il contenuto di carotenoidi, acido ascorbico e polifenoli totali nei frutti maturi del pomodoro di Montagano.

Caratterizzazione genetica

Risultati

Disegno sperimentale ed estrazione del DNA

L'analisi è stata condotta su un panel di 6 campioni di pomodoro comprendente piante provenienti da seme controllato (DeCo) del comune di Montagano prodotto nel 2019 (3 piante) e 2018 (1 pianta), 1 pianta prodotta da seme di vivaio ed infine un'altra pianta originata da seme autoprodotta da una azienda agricola dell'area di Montagano (Tabelle 1). L'inserimento degli ultimi 2 campioni di pomodoro (da vivaio e azienda agricola), considerati come possibili competitor del Comune di Montagano, è stata fatta con l'intento di verificare la loro "identità" rispetto a quella del "pomodoro controllato" dal comune molisano.

Dal materiale verde (foglie) di ciascun campione di pomodoro si è proceduto con la preparazione del DNA genomico e con la verifica, mediante l'impiego di specifiche analisi di biologia molecolare, della sua integrità e qualità (assenza di proteine e di molecole indesiderate) caratteri questi fondamentali per un buon successo del sequenziamento di nuova generazione (NGS).

Un'aliquota (circa 1 µg) di ciascun campione di DNA è stato poi processato come indicato dal protocollo RESTseq messo a punto presso i laboratori di Alsia-CRMA per la piattaforma NGS Ion Torrent (PGM).

Campione	Codice Campione	n. di piante analizzate
Montagano_seme DeCo_2019	1	1 pianta
Montagano_seme DeCo_2019	2	1 pianta
Montagano_seme DeCo_2019	3	1 pianta
Montagano seme vivaio	4	1 pianta
Montagano seme DeCo_2018	5	1 pianta
Montagano seme azienda agricola_7	6	1 pianta

Tabella 1. Lista dei campioni di pomodoro di Montagano impiegati nelle analisi di caratterizzazione genetica e biochimica.

Preparazione delle librerie e analisi di dati NGS

Le librerie dei 6 campioni di pomodoro sono state preparate mediante l'utilizzo del kit "Ion Plus Fragment Library" (Life Technology) e sequenziate su un chip Ion 318 insieme alle librerie preparate da 6 repliche biologiche di un ecotipo di pomodoro lucano con proprietà molto simili a quelle di Montagano e perciò inserito nell'analisi come elemento di confronto.

In totale sono state prodotte circa 6.000.000 di reads (frammenti sequenziati) con una media di circa 450.000 reads/campione e un numero di basi *per* read pari a 242 bp.

I frammenti sequenziati (reads) sono stati mappati sul genoma di riferimento di *Solanum lycopersicum*, cv *Heinz 1706* (ftp://ftp.solgenomics.net/tomato_genome) e il 91,5 % di essi (circa 5.500.000 reads) sono stati allineati in regioni non ripetute (uniquely mapped) del genoma di pomodoro.

L'analisi bioinformatica e l'uso dei software della piattaforma ION hanno consentito l'identificazione di circa 5.000 differenze nucleotidiche (SNPs) nei 12 campioni di pomodoro (6 campioni molisani e 6 lucani) rispetto al reference presente in banca dati.

Dei 5.000 SNP individuati 1240 sono stati selezionati ed impiegati in un'analisi di distanza genetica tra i campioni di pomodoro molisano e quelli lucani finalizzata alla verifica del grado di similarità/diversità tra i due ecotipi di pomodoro.

Il risultato di tale analisi effettuata con il software GenAlex 6.5 (<http://biologyassets.anu.edu.au/GenALEX/Welcome.html>) è stato che i due gruppi di campioni,

molisano e lucano, trattati come due popolazioni distinte, sono molto simili tra loro come evidenziato dal basso valore (0,059) di distanza genetica nella matrice riportata in Tabella 2.

<i>Pomodoro o molisano</i>	<i>Pomodoro o lucano</i>	
0,000		<i>Pomodoro o molisano</i>
0,059	0,000	<i>Pomodoro o lucano</i>

Tabella 2. Matrice di distanza genetica (distanza di Nei) tra il gruppo di pomodori molisano (ecotipo Montagano) e quello lucano. Nella distanza di Nei il valore è compreso tra “0” e “1”, con “zero” che indica assenza di differenza e “uno” completamente diversi.

Profilo genetico dell’ecotipo di Montagano

Dalla lista dei 1240 SNP selezionati nel panel di pomodoro molisano e lucano sono stati successivamente selezionati 1116 SNP che sono risultati polimorfici tra il genotipo Montagano ovvero quello delle piante prodotte da seme 2019 e 2018 controllato dal comune di Montagano (seme DeCo) e la sequenza di riferimento del pomodoro presente in banca dati.

Nella Tabella 3 dell’ Allegato 1 è riportata la lista dei 1116 SNP che definiscono il profilo genetico dell’ecotipo pomodoro di Montagano. In tale Tabella, per ciascuna differenza nucleotidica (SNP) si riporta il cromosoma in cui è localizzata, la sua posizione nucleotidica, l’identità del cambio (Variante) identificato nel panel di pomodoro analizzato rispetto al genoma di riferimento disponibile in banca dati (Riferimento) e la sua condizione allelica (omozigote o eterozigote) nel genotipo di Montagano.

Dei 1116 loci (SNP), il 78% (868 SNP) è in omozigosi, il rimanente 22% (248) è in eterozigosi quindi ancora segreganti e non ancora fissati.

In Figura 1 è invece riportata la distribuzione delle 1116 differenze nucleotidiche nei cromosomi del pomodoro di Montagano.

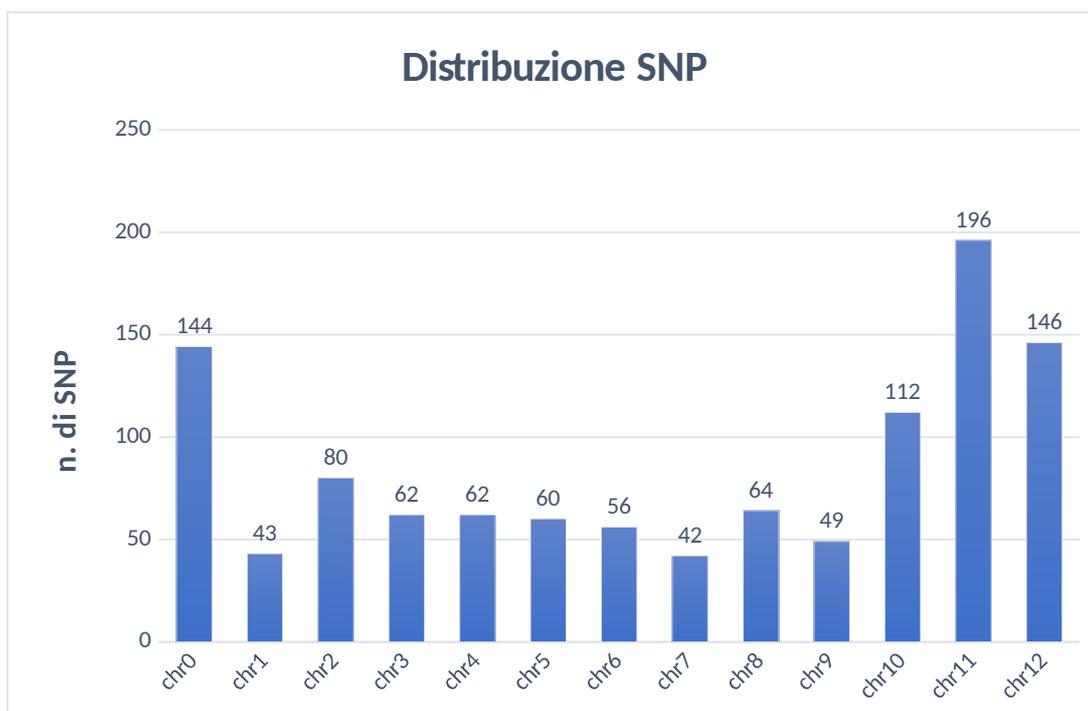


Figura 1. Distribuzione degli SNP (1116) nei 12 cromosomi di pomodoro. Con “chr0” sono indicate le regioni di pomodoro non ancora assegnate a uno dei 12 cromosomi. Il numero di SNP identificati per cromosoma è riportato alla sommità di ciascuna barra dell’istogramma.

Selezione di SNP specifici del genotipo di Montagano

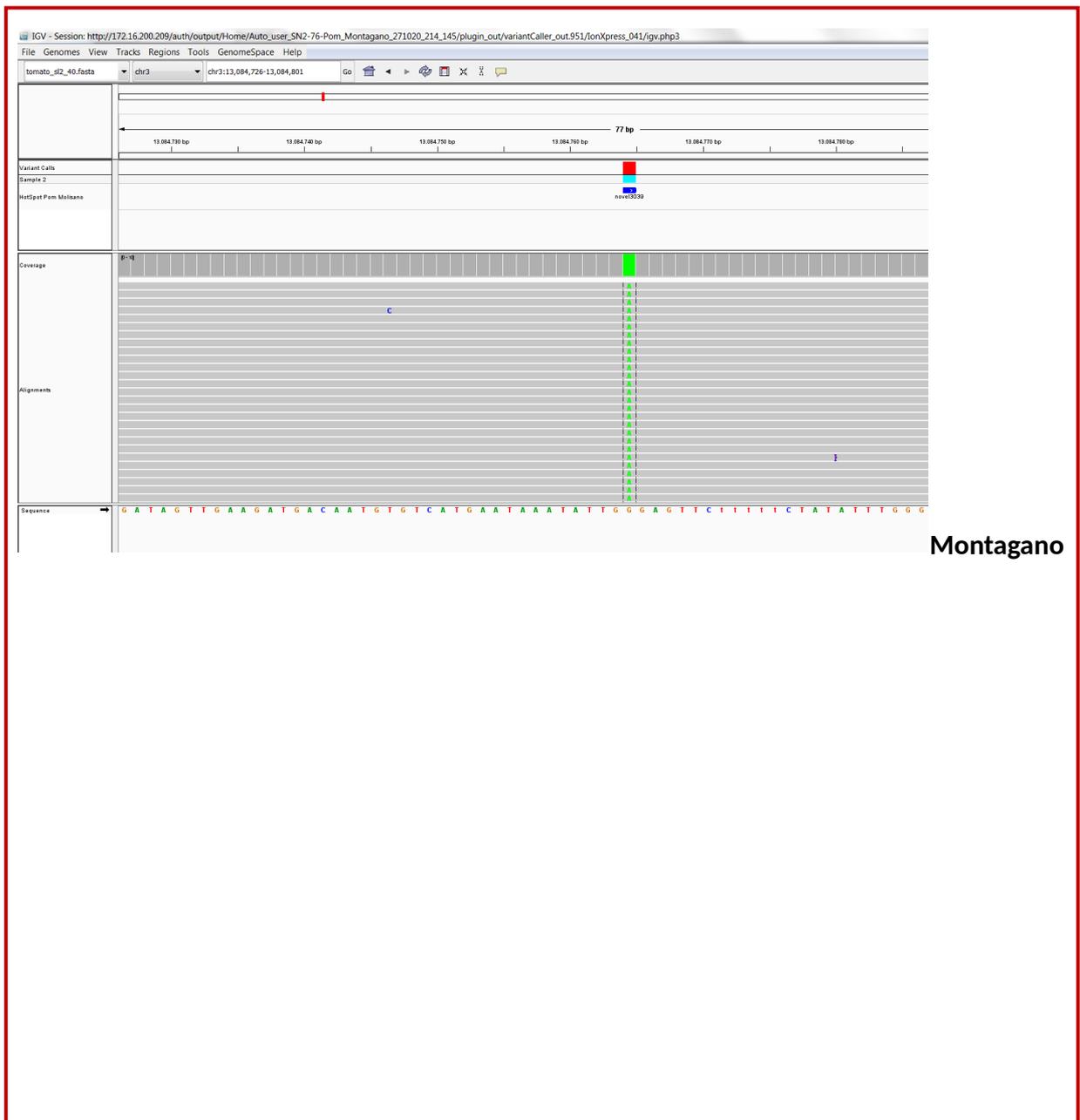
Dal confronto tra il profilo genetico del pomodoro di Montagano con quello dell’ecotipo lucano sono stati individuati 30 SNP Montagano-specifici ovvero sono state identificate delle differenze, a livello di singolo nucleotide, che sono presenti nel pomodoro molisano e assenti in quello lucano. La lista degli SNP specifici dell’ecotipo di Montagano è riportata nella Tabella 4. Delle 30 differenze nucleotidiche (SNP), 22 sono in omozigosi e 8, evidenziate in grassetto, in eterozigosi.

Codice SNP (n.)	Cromosoma	Posizione	Riferimento	Montagano Variante	Montagano condizione allelica	
1	chr1	1899257	T	G	T	G
2	chr1	1899379	A	G	A	G
3	chr1	8558674	T	C	C	C
4	chr2	1569549 9	C	A	C	A
5	chr3	1125292 2	T	A	A	A
6	chr3	1147859 8	G	T	T	T
7	chr3	1209881 4	T	C	C	C
8	chr3	1209891 5	C	T	T	T
9	chr3	1209900 9	A	T	T	T
10	chr3	1308476 4	G	A	A	A
11	chr3	1376761 9	A	G	G	G
12	chr3	1391227 7	C	T	T	T
13	chr3	2763168 8	T	C	C	C
14	chr3	2803838	C	T	T	T
15	chr3	4080754 6	G	T	T	T
16	chr3	4306710 0	T	C	C	C
17	chr4	1325869 3	C	T	T	T
18	chr4	2784651	C	A	C	A
19	chr4	2784685	T	C	T	C
20	chr4	2784771	C	A	C	A
21	chr5	2156859	C	T	T	T
22	chr5	2156955	T	G	G	G
23	chr5	3906474 4	C	T	T	T
24	chr5	3927944 4	T	A	A	A
25	chr7	1602695 3	T	G	G	G
26	chr7	3002884 7	C	T	C	T
27	chr8	3796590 4	G	C	C	C
28	chr8	5151983	C	T	T	T

29	chr9	1495320 3	C	T	T	T
30	chr11	3394216 6	G	T	G	T

Tabella 4. Lista degli SNP specifici del genotipo di Montagano selezionati dal confronto con l’ecotipo di pomodoro lucano. Per ciascuna differenza nucleotidica (SNP) si riporta il cromosoma in cui è localizzata, la sua posizione nucleotidica, l’identità del cambio (Variante) identificato nel panel di pomodoro analizzato rispetto al genoma di riferimento disponibile in banca dati (Riferimento) e la sua condizione allelica (omozigosi o eterozigosi) nel genotipo di Montagano.

Nelle Figure 2 e 3 sono mostrati, graficamente, due esempi di SNP specifici dell’ecotipo di Montagano.



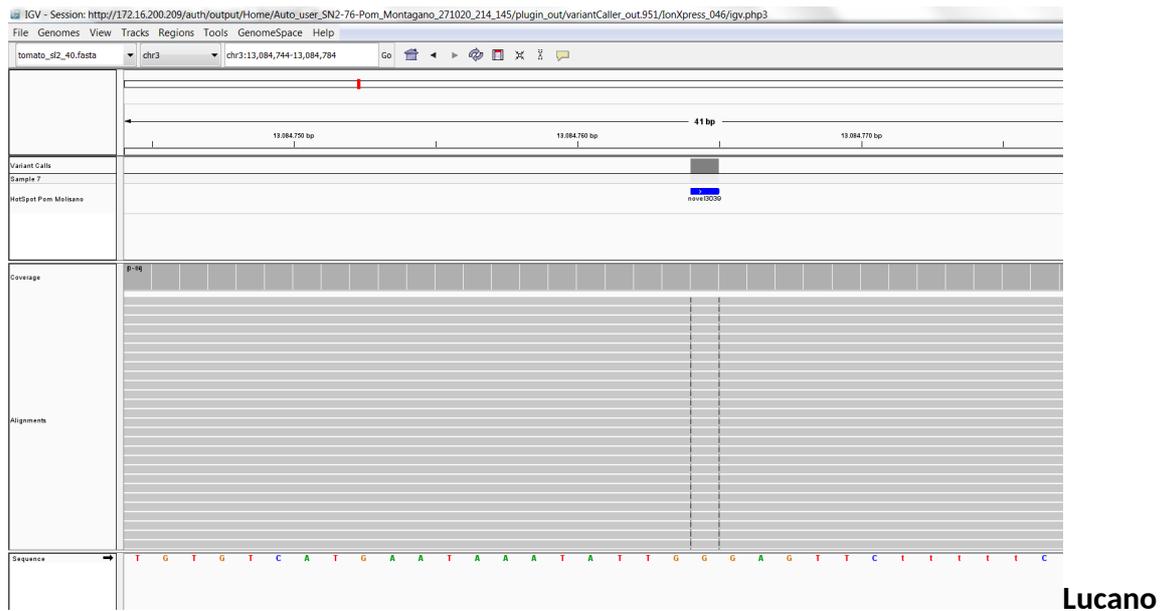
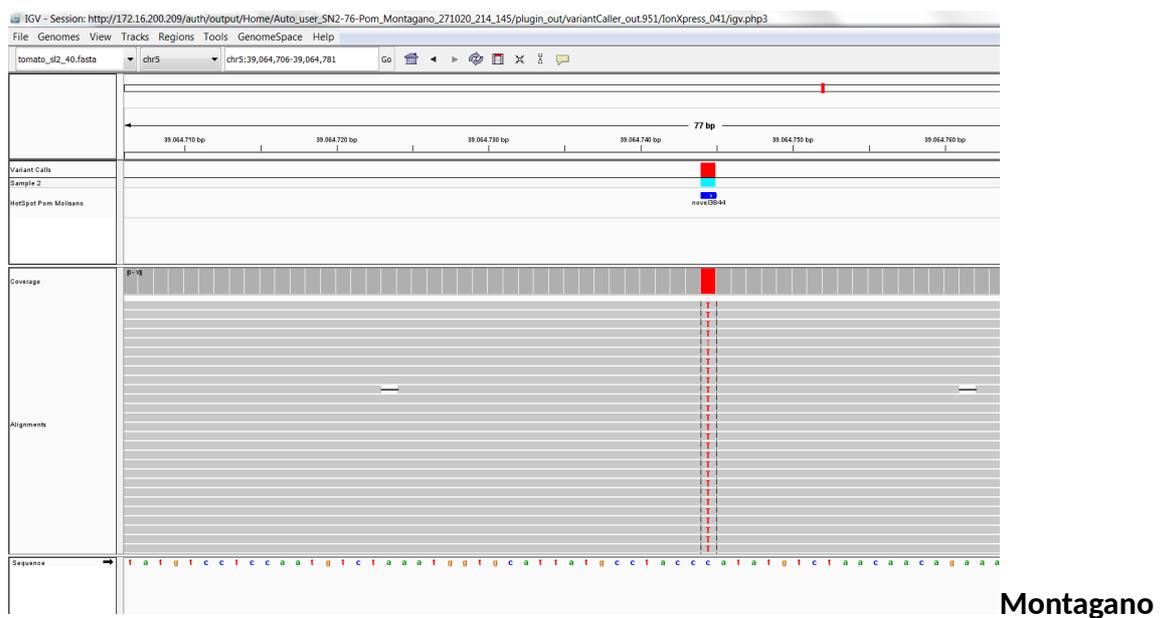


Figura 2. Esempio di differenza nucleotidica (SNP) genotipo-specifica. L'ecotipo di pomodoro Montagano, nella posizione 13084764 (evidenziata dalle due linee tratteggiate) del cromosoma 3 (Chr03) è omozigote A/A, mentre nella stessa posizione l'ecotipo di pomodoro lucano è uguale al genoma di riferimento della banca dati ed è omozigote G/G.



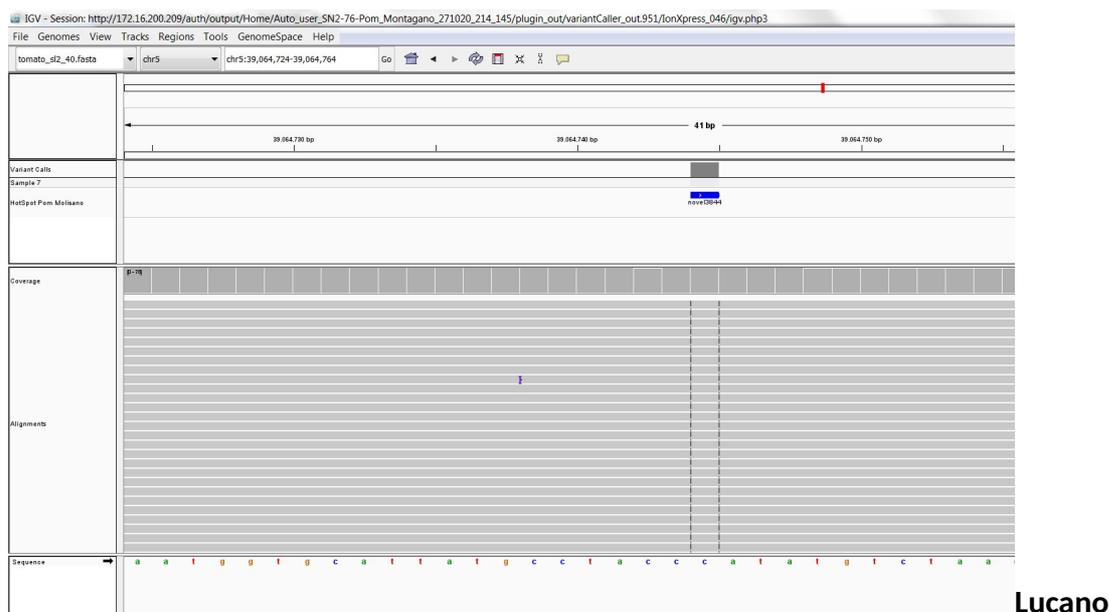


Figura 3. Esempio di differenza nucleotidica (SNP) genotipo-specifica. L'ecotipo di pomodoro Montagano, nella posizione 39064744 (evidenziata dalle due linee tratteggiate) del cromosoma 5 (Chr05) è omozigote T/T, mentre nella stessa posizione l'ecotipo di pomodoro lucano è uguale al genoma di riferimento della banca dati ed è omozigote C/C.

Analisi di confronto tra pomodoro prodotto da seme controllato dal comune di Montagano e quello prodotto da seme di vivaio e autoprodotta da azienda agricola

I 1116 loci selezionati e che definiscono il profilo genetico dell'ecotipo di pomodoro di Montagano sono stati utilizzati in un'analisi di confronto con i campioni di pomodoro provenienti da seme di vivaio e autoprodotta da azienda agricola.

Nell'analisi di confronto è stato verificato:

- 1) se i loci selezionati nel pomodoro prodotto da seme controllato dal comune di Montagano (seme DeCo) sono presenti negli altri 2 campioni di pomodoro (vivaio e azienda agricola);
- 2) il loro stato allelico.

Il risultato (Tabella 5, Allegato 2) è stato che tutte le varianti (SNP) identificate e selezionate nel background genetico di Montagano sono presenti nei 2 campioni di pomodoro prodotte da seme non controllato dal comune di Montagano. Le uniche differenze (evidenziate in grigio) che si osservano sono a livello di stato allelico delle varianti (omozigosi o eterozigosi) confermando quanto osservato in precedenza ovvero che il background genetico del pomodoro di Montagano presenta una elevata eterozigosità.

Confronto tra pomodoro di Montagano e pomodoro San Marzano

Con l'obiettivo di verificare la similarità dell'ecotipo di pomodoro di Montagano con il background genetico del pomodoro San Marzano, circa 125.000 SNP del genotipo campano identificati mediante confronto con il genoma di riferimento *Heinz 1706*, e presenti in banca dati (https://solgenomics.net/jbrowse/JBrowse-1.11.4/?data=data%2Fjson%2Ftomato_variants&loc=SL2.40ch02%3A1..39941175&tracks=DNA&highlight=), sono stati testati nel panel di pomodoro molisano.

L'analisi ha prodotto come risultato la condivisione di 168 loci (SNP) tra i due genotipi di pomodoro di cui il 52% (87 SNP) sono risultati polimorfici (diversi).

Nella Tabella 6 dell'Allegato 3 si riporta la lista dei loci condivisi dal pomodoro di Montagano e San Marzano, la loro posizione nucleotidica nel cromosoma, l'identità della variante identificata nel pomodoro San Marzano (San Marzano) rispetto al genoma di riferimento disponibile in banca dati (Riferimento) e l'identità nucleotidica (Montagano) nel genotipo di Montagano. In grassetto sono evidenziati gli SNP (n. 87) diversi tra i due genotipi di pomodoro.

Nella Figura 4 è invece mostrata la distribuzione dei 168 loci nel patrimonio genetico (cromosomi) di *Solanum lycopersicum*.

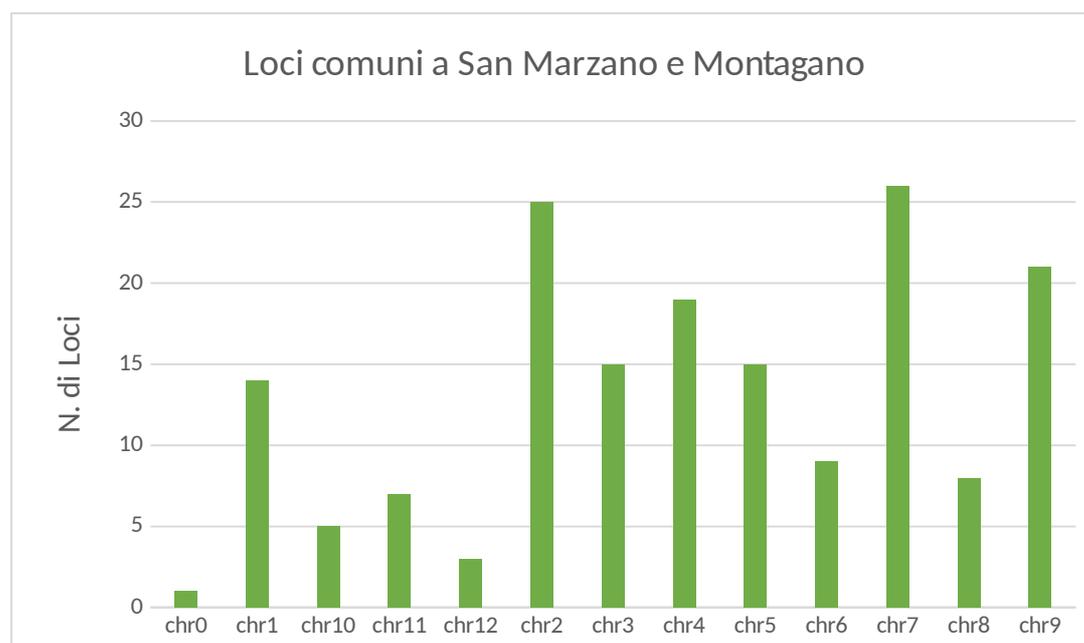


Figura 4. Distribuzione dei 168 loci (SNP) presenti sia nell'ecotipo di pomodoro di Montagano che nel genotipo San Marzano.

Caratterizzazione biochimica

Risultati

La determinazione del contenuto di carotenoidi, acido ascorbico e polifenoli totali è stata condotta nei frutti rossi di pomodoro raccolti dalle piante indicate in Tabella 1.

Le bacche mature, all'arrivo nei laboratori del centro ricerche Alsia-Metapontum Agrobios, sono state subito processate (eliminazione dei semi) e congelate a -80 C.

Il materiale così conservato è stato successivamente liofilizzato ed impiegato nelle analisi biochimiche.

Utilizzando i protocolli riportati in Allegato 4 è stato determinato, mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), il contenuto dei principali carotenoidi presenti nei frutti rossi di pomodoro, la quantità di vitamina C e di polifenoli totali. I risultati delle analisi biochimiche sono riportati nelle Tabelle 7, 8 e 9.

Codice Campione	Luteina µg/g DW	β-carotene µg/g DW	Licopene µg/g DW	Carotenoidi Totali µg/g DW
1	43.74	95.75	588.42	727.91
2	22.60	73.26	845.62	941.48
3	28.22	75.28	700.52	804.01
4	48.00	195.18	1148.88	1392.06
5	21.08	22.11	429.18	451.29
6	28.19	128.68	1025.85	1182.72

Tabella 7. Contenuto dei principali carotenoidi, luteina, β-carotene e licopene nei frutti rossi di pomodoro di Montagano. In tabella si riporta anche il contenuto, espresso in µg/g DW (Dried Weight), dei carotenoidi totali.

Codice Campione	Acido ascorbico mg/g DW
1	4.34

2	4.10
3	4.52
4	3.23
5	3.38
6	2.15

Tabella 8. Contenuto di acido ascorbico (Vitamina C) espresso in mg/g DW (Dried Weight).

Codice campione	Polifenoli totali mg/gDW
1	3.10
2	3.34
3	2.86
4	3.32
5	7.31
6	3.48

Tabella 9. Contenuto di polifenoli totali rilevati mediante HPLC nelle bacche mature del pomodoro di Montagano.

Discussione e Conclusioni

Con l'impiego di una delle moderne tecniche della genomica (RESTseq), basata sul sequenziamento di nuova generazione (NGS) sono state identificate differenze nucleotidiche (SNPs) tra l'ecotipo di pomodoro Montagano e la sequenza di pomodoro presente in banca dati.

Gli SNP individuati e selezionati (1116 SNP) sono ben distribuiti nel genoma di Montagano. Il loro numero per cromosoma varia da un minimo di 42 (ch07) ad un massimo di 196 (ch11). Le informazioni sulla posizione e identità delle differenze nucleotidiche (SNPs) hanno permesso di definire il profilo genetico del pomodoro di Montagano.

Dall'analisi tra i profili genetici dell'ecotipo di pomodoro di Montagano e quello lucano, inserito nello studio come elemento di confronto, sono stati individuati 30 SNP specifici del genoma di Montagano. Il 73% di tali SNP sono in omozigosi mentre il restante 27% è in eterozigosi e pertanto ancora segregante. Tali SNP sono degli ottimi candidati ad essere utilizzati come marcatori molecolari nelle analisi di identificazione varietale del pomodoro di Montagano rispetto all'ecotipo lucano che dal punto di vista fenotipico (morfologia della bacca) è molto simile al pomodoro molisano e come questo ultimo richiede poca acqua per la sua coltivazione. Le sequenze geniche contenenti gli SNP identificati sono riportate in Allegato 5.

Dall'analisi di confronto tra il profilo genetico del pomodoro di Montagano, prodotto da seme controllato del Comune, con i profili genetici di piante di pomodoro prodotte da seme di vivaio o autoprodotta da azienda agricola è risultato che il profilo genetico del pomodoro di Montagano è conservato nei campioni esaminati. Le differenze (condizione allelica o assenza/presenza della variante) che si osservano tra i campioni in esame sono da attribuire all'elevata eterozigosità (circa il 22%) del genoma di Montagano e all'impiego, nell'analisi, di una sola replica biologica per il materiale prodotto da vivaio o autoprodotta da azienda agricola.

L'interrogazione di circa 125.000 SNP del pomodoro San Marzano nel background genetico di Montagano ha permesso l'identificazione di 168 loci condivisi dai due genotipi di pomodoro. Il basso numero di loci rilevati è da attribuire fondamentalmente ai due diversi approcci di sequenziamento utilizzati per i due genotipi di pomodoro analizzati. Nel caso del pomodoro di San Marzano il rilievo dei 125.000 SNP è stato ottenuto dal ri-sequenziamento completo del suo genoma mentre per Montagano il suo profilo genetico è stato prodotto dal sequenziamento di una piccolissima frazione del suo patrimonio genetico (circa 2,1 Mb vs i 900 Mb del genoma di pomodoro) effettuato con l'approccio RESTseq.

I 168 loci sono distribuiti su tutti (12) i cromosomi di pomodoro e il 52 % di essi sono polimorfici (diversi) tra il pomodoro San Marzano e il pomodoro di Montagano. I loci (SNP) polimorfici possono essere utilizzati come marcatori molecolari nelle analisi di riconoscimento varietale del pomodoro di Montagano rispetto al pomodoro San Marzano. Le sequenze degli 87 SNP sono riportate in Allegato 6.

Le analisi sul contenuto di carotenoidi , vitamina C e polifenoli hanno contribuito alla definizione del profilo biochimico dell'ecotipo di pomodoro molisano. Il confronto con altri genotipi di pomodoro, allevati nelle stesse condizioni in uno schema sperimentale appropriato (i.e. randomizzazione), potrà aiutare a identificare e quindi valorizzare l'eventuale tratto biochimico-specifico del pomodoro di Montagano.

In conclusione con il presente studio di caratterizzazione genetica e biochimica è stato/sono stati:

- 1) definito il profilo genetico dell'ecotipo di pomodoro di Montagano;

- 2) rilevato che il pomodoro di Montagano presenta un'alta percentuale di eterozigotità con circa il 22% dei loci ancora segreganti;
- 3) verificato che il profilo genetico del pomodoro prodotto dal seme controllato del comune di Montagano è conservato anche nei due competitor (vivaio e azienda agricola) inseriti nell'analisi;
- 4) identificati SNP che possono essere utilizzati nel riconoscimento varietale di Montagano *versus* l'ecotipo lucano di pomodoro (30 SNP) e il pomodoro San Marzano (87 SNP);
- 5) determinato il contenuto dei carotenoidi, di vitamina C e di polifenoli nei frutti maturi dei campioni analizzati.

Bibliografia

1. Eckart Stolle, Robin F. A. Moritz (2013) "RESTseq – Efficient Benchtop Population Genomics with RESTriction Fragment SEQuencing". PLoS ONE 8(5): e63960.[doi:10.1371/journal.pone.0063960](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063960)