

Proposta scientifica ed analisi dei costi per la caratterizzazione molecolare di varietà locali del Lazio di pomodoro, sedano e brassiche

Prof. Andrea Mazzucato, Ph.D., Dip. di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE)
Laboratorio di Biotecnologie delle Colture Orticole, Università della Tuscia
Via S. C. de Lellis, snc - 01100 VITERBO, ITALY
Tel: +39 0761 357370 (306) E-mail: mazz@unitus.it

PREMESSA

Il “Piano Settoriale d’Intervento per la tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario (LR 15/2000) - triennio 2018-2020” - indica la necessità di avviare indagini di caratterizzazione genetico-molecolare delle accessioni di specie ortive, tra cui sedano, pomodoro e diverse brassiche, collezionate nel corso del censimento svolto da ARSIAL. Inoltre, sia al fine di individuare opportune strategie per la conservazione in situ/on farm delle varietà locali di specie ortive già tutelate, sia in vista di una loro possibile iscrizione come “varietà da conservazione” al Registro Nazionale, risulta necessario approfondire gli studi sulla loro variabilità genetica.

Il Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali (DAFNE) dell’Università degli Studi della Tuscia conduce ricerche in campo agrario e forestale volte al miglioramento dei sistemi di produzione e della salubrità dei prodotti di origine animale e vegetale, alla salvaguardia e alla caratterizzazione della biodiversità, alla tutela del paesaggio ed al trasferimento tecnologico. I ricercatori del DAFNE hanno competenze nel campo dell’agronomia, della genetica e del breeding animale e vegetale, nelle scienze zootecniche, delle stime di sostenibilità, dell’applicazione di indicatori agro-ambientali e di sistemi informativi geografici. Dal 2018, il DAFNE è stato ammesso tra i vincitori del bando MIUR “Dipartimenti di Eccellenza” (Legge 232/2016) con il Progetto SAFE-MED.

Il Gruppo di ricerca di cui è responsabile il Prof. Andrea Mazzucato opera presso il DAFNE, Laboratorio di Biotecnologie delle Colture Orticole, e vanta un’esperienza pluridecennale nel campo della collezione, caratterizzazione e conservazione del germoplasma, dello studio della biologia riproduttiva, dell’applicazione di biotecnologie e del miglioramento genetico per produzione, qualità e resistenza in specie orticole. Il gruppo gestisce una collezione di germoplasma di pomodoro che include oltre 800 accessioni di varietà locali, cultivar moderne e obsolete, breeding lines, stock genetici, mutanti e specie selvatiche. Nel campo dello studio e dell’utilizzo della biodiversità delle specie orticole, il gruppo di ricerca ha svolto attività nell’ambito di progetti a livello locale, nazionale ed internazionale (Soressi et al. 2007; Rao et al. 2009; Lin et al. 2014). A livello nazionale ha svolto indagini morfo-molecolari sistematiche del germoplasma di pomodoro autoctono (progetto Scigno, progetto Traditom; Nanni et al. 2005; Mazzucato et al. 2008; Mazzucato et al. 2010b; Sacco et al. 2015; Baldina et al. 2016) e studi specifici su varietà di Lazio (Mazzucato et al. 1998; Mazzucato et al. 2006) e Abruzzo (Mazzucato et al. 2010a). Altre ricerche hanno riguardato varietà locali di fagiolo (Santangelo et al. 2006; Paniconi et al. 2010; Raggi et al. 2014) e lenticchia (dati non pubblicati). Il Prof. Mazzucato è stato promotore dell’iscrizione delle varietà locali di pomodoro Scatolone di Bolsena e Spagnoletta del golfo di Gaeta e Formia nel Registro Volontario Regionale delle risorse genetiche autoctone della regione Lazio. E’ stato referente presso l’Università della Tuscia per il progetto Biodiversità Brasile-Italia del Ministero Affari Esteri. E’ stato Responsabile di U.O. in due progetti biennali COFIN-MIUR e nel Progetto Strategico biennale SCRIGNO, MIUR-CNR. E’ stato componente di U.O. in progetti nazionali (MIUR, MiPAF, CNR), europei (PHASELIEU, TRADITOM) ed internazionali (MAE-IAO) e responsabile scientifico o collaboratore in convenzioni con partner privati (Cirio, Syngenta, Barilla, Agrobios, Enza Zaden) e pubblici (Consorzio Ballatore, CREA, IAO, ENEA).

Proposta scientifica

La presente proposta è formulata con l'obiettivo di caratterizzare a livello molecolare il germoplasma autoctono della regione Lazio di pomodoro, sedano e brassiche, al fine di mettere in evidenza la diversità intra ed inter-varietà locale, nonché la distinguibilità delle accessioni del Lazio da quelle di regioni limitrofe o commerciali. La scelta di materiali e metodi è stata ponderata in modo da adottare sistemi di analisi moderni, che garantiscano confrontabilità con dati già presenti in letteratura e che favoriscano la pubblicazione dei risultati anche su riviste internazionali.

Pomodoro

Razionale per la scelta del sistema: recentemente le collezioni di pomodoro, incluse quelle italiane, sono state ampiamente genotipizzate tramite marcatori *single nucleotide polymorphism* (SNP) in diversi progetti internazionali (Traditom, G2PSol, etc.) i cui risultati sono in gran parte ancora non pubblicati. L'uso di marcatori SNP risulta quindi una scelta obbligata ai fini della completezza e confrontabilità dell'informazione. Si propone di usare la tecnica tGBS (Ott et al. 2017) che consente di rilevare un numero elevato di marcatori (es. 200 SNP) con alta qualità e di selezionare i marcatori a priori con il criterio di ottimizzare l'informazione (marcatori funzionali, polimorfismi noti, QTL, marcatori "chiave" in altre caratterizzazioni, etc.).

Materiali: saranno incluse tutte le accessioni della collezione ARSIAL, controlli di regioni limitrofe (es. Costoluto fiorentino, A pera abruzzese, San Marzano), controlli standard (MoneyMaker, Ailsa Craig, M82) e accessioni di provenienza locale della collezione UNITUS. Per cinque varietà di maggiore importanza (Scatolone di Bolsena, Spagnoletta di Formia e Gaeta, Corno di Toro di Rieti, Da secca di Minturno, Fiaschetta) saranno incluse tre accessioni con tre individui per accessione al fine di valutare la variabilità intravarietale. Il totale di campioni sarà pari a 128.

Metodi: allevamento e fenotipizzazione (UNITUS), campionamento ed estrazione del DNA (UNITUS), analisi genotipiche di marcatori SNP con tecnologia tGBS per un totale di 200 marcatori "targeted" per campione (VHL Genetics), analisi dati e presentazione (UNITUS/ARSIAL).

Sedano

Razionale per la scelta del sistema: l'utilizzo di marcatori multilocus random su campioni costituiti da bulk di piante diverse è stato adottato con successo in questa specie; pertanto si propone l'analisi con marcatori AFLP anche in virtù di garantire la confrontabilità con studi precedenti (Torricelli et al. 2013). Visto l'interesse all'uso dell'analisi molecolare anche per saggiare la conformità al tipo dei materiali circolanti tra i produttori, si propone di saggiare in parallelo l'efficienza di marcatori della stessa tipologia (multilocus random) come gli "inter-microsatelliti" (ISSR) sugli stessi campioni. Gli ISSR risultano marcatori più economici e di più rapida applicazione. Il confronto tra risultati ottenuti con AFLP e ISSR sullo stesso materiale costituisce un elemento originale di analisi e di rilevante interesse applicativo.

Materiali: si propone di analizzare 12 accessioni, comprendendo un campionamento consistente del germoplasma del Sedano bianco di Sperlonga (5-6 accessioni), una o più accessioni di seme della stessa varietà reperito in loco, una o più accessioni di regioni limitrofe (es. Sedano nero di Trevi), una o più accessioni commerciali. Essendo il sedano pianta allogama e per limitare i costi, si propone di lavorare in bulk seguendo una strategia già adottata (Torricelli et al. 2013), analizzando per ogni accessione quattro bulk di 5-10 piante (da decidere). In totale il numero di campioni sarà 48.

Metodi: allevamento e (eventuale) fenotipizzazione (ARSIAL), campionamento ed estrazione del DNA (UNITUS), analisi genotipiche di AFLP (Breedomics/UNIPD), analisi genotipiche ISSR (UNITUS), analisi dati e presentazione (UNITUS/ARSIAL).

Brassiche

Razionale per la scelta del sistema: l'uso dei microsatelliti (SSR) è stato ampiamente adottato nell'analisi della variabilità in *Brassica*, anche per varietà locali italiane (Ciancaleoni et al. 2014). Si propone di analizzare 15-20 loci SSR, tenendo in considerazione nella scelta la tipologia (genici vs genomici), la posizione di mappa e il grado di polimorfismo stimato in precedenti studi. Data la vicinanza tassonomica, si ritiene che i primer disegnati su sequenze di *B. oleracea* siano in grado di amplificare anche *B. rapa*; la trasferibilità dei marcatori tra specie affini deve tuttavia essere verificata. I marcatori saranno sviluppati presso i nostri laboratori con l'appoggio dello Spin Off Phydia per la corsa e la rilevazione.

Materiali: saranno incluse 12 accessioni ARSIAL rappresentative dei materiali iscritti e non, riferibili ai taxa *Brassica rapa* var. *sylvestris* (cima di rapa), *B. oleracea* convar. *botrytis* var. *cymosa* (broccolo) e *B. oleracea* var. *capitata* (cavolfiore) più cinque controlli, includendo un ibrido commerciale per ciascuna tipologia tassonomica e due varietà locali di regioni limitrofe (Campania e/o Toscana). Data la natura allogama delle specie, saranno campionati 8 individui per accessione, per un totale di 128 campioni.

Metodi: allevamento e (eventuale) fenotipizzazione (ARSIAL), campionamento ed estrazione del DNA (UNITUS), analisi genotipiche di microsatelliti (UNITUS/PHYDIA), analisi dati e presentazione (UNITUS/ARSIAL).

Piano economico

Personale

Tipologia	Costo annuo lordo	Costo unitario	Numero mesi/giorni/ore a carico del progetto	Totale a carico del progetto
Assegnista	23.787	1982 (mese)	12 mesi	23.787
Bracciante agricolo stagionale (BAS)		94,90 (giorno)	20 giornate	1.898
Totale personale				25.685

Il calcolo dei costi di personale, interamente dedicato al progetto, è basato sulle definizioni del DAFNE per gli assegni di ricerca (Preventivo n. 4) e sulla tariffa giornaliera del personale avventizio (Bracciante Agricolo Stagionale, BAS, Preventivo n. 5).

Spese missioni

Tipologia	N. missioni	N. ricercatori	Luogo	Costo unitario	Costo totale
Missioni due persone presso stazioni ARSIAL per campionamento con mezzo proprio	6	2	Tarquinia, Comino	400	2.400
Missioni presso ARSIAL per riunioni di progetto	5	2	Roma	100	500
Missioni presso fornitori di servizi e collaboratori	1	1	Padova	500	500
Totale Missioni					3.400

Divulgazione

Tipologia	N. ricercatori	Registrazione	Altri costi di trasferta	Costo totale presunto
Partecipazione a convegno nazionale (es. Convegno Annuale Società Italiana di Genetica Agraria)	2	350	350	700 x 2
Partecipazione a convegno internazionale	1	700	700	1.400
Totale				2.800

Si porta a preventivo la ricevuta di iscrizione ad un congresso nazionale (Preventivo n. 6) e ad uno internazionale (Preventivo n. 7), stimando uguale importo per spese di vitto, alloggio e trasporto. Tali ultime spese non possono essere preventivate con dettaglio, non conoscendo a priori le località dei convegni ed i relativi costi.

Predisposizione materiale divulgativo

N. 2 pubblicazioni *open access* su riviste internazionali. Si allegano preventivi dell'*Article Processing Charge* al netto delle tasse di Frontiers in Plant Science (2950 \$, Preventivo n. 8), Diversity (1200 CHF, Preventivo n. 9) e Horticultural Research (1800 €, Preventivo n. 10). Per un costo medio di 2000 €, il costo totale stimato ammonta a **4.000 € + IVA/VAT**.

Esecuzione di prelievi e analisi di laboratorio

- Si portano a preventivo i costi dei servizi esterni per genotipizzazione di campioni di pomodoro con analisi ddRAD (Preventivo n. 11), SolCAP (Preventivi n. 12-14) e tGBS (Preventivo n. 15). Per quanto esposto nella narrativa scientifica, si propone di sviluppare, con tecnica tGBS, 200 marcatori su 128 campioni con un prezzo unitario di 39 €: $(128 \times 39) = \mathbf{5000 \text{ €}}$
- Phydia: costo a corpo per corsa in RT-PCR ed analisi delle curve risultanti di massimo 3.000 campioni di marcatori SSR sviluppati in Brassica (Preventivo n. 16): **1.500 €**
- Breedomics (Preventivo n. 17): analisi AFLP su 48 campioni di sedano in quattro combinazioni di primer $(1860 \times 2) = \mathbf{3720 \text{ €}}$
- Prezzo utenza serra presso Azienda Agraria Didattico Sperimentale Nello Lupori, Università degli Studi della Tuscia; un bancale per 10 mesi: **300 €**
- lavorazioni presso Azienda Agraria Didattico Sperimentale Nello Lupori per allevamento pomodoro in due stagioni (2020 e 2021; cfr Preventivo n. 18): **600 €**
- Manutenzione cella di crescita/germinatoio e tunnel (cfr. Preventivi n. 1-2), costo preventivato: **800 €**.

Acquisto di beni (prezzi IVA inclusa)

Tipologia	Bene	Costo unitario medio	Preventivo n.	Quantità	Costo totale
Plastiche monouso	Puntali da 10 ul (1000 pz)	20	19, 20, 23	10	200
	Puntali da 200 ul (1000 pz)	13	19, 20, 23	10	130
	Puntali da 1000 ul (1000 pz)	17	19, 20, 23	10	170
	Guanti monouso (tg S,M,L, 100 pz)	7	19, 20, 23	10	70
	Provette per centr. 0,5 ml (500 pz)	45	19, 20, 23	5	225
	Provette per centr. 1,5 ml (1000 pz)	45	19, 20, 23	5	225
	Provette per centr. 2 ml (1000 pz)	80	19, 20, 23	5	400
	Tubi per centr. 15 ml ster. (500 pz)	110	19, 20, 23	4	440
	Tubi per centr. 50 ml ster. (500 pz)	120	19, 20, 23	4	480
	Strip 8 microprovette tappo (125 pz)	160	19, 20, 23	8	1.280
	Piastre da PCR 96 pozzetti (25 pz)	70	19, 20, 23	6	420
	Pellicola di chiusura per piastre PCR 96 pozzetti (100 pz)	165	19, 20, 23	1	165
	Carta da banco (100 pz)	15	19, 20, 23	6	90
	Parafilm	50	19, 20, 23	3	150
	Reagenti generici	Etanolo assoluto 2,5 L	95	19, 20, 23	2
Isopropanolo 1L		30	19, 20, 23	1	30
Cloroformio:isoamilico 24:1 1 L		82	19, 20, 23	1	82
TRIS 1Kg		150	19, 20, 23	1	150
EDTA 1 Kg		140	19, 20, 23	1	140
Potassio acetato 500 g		80	19, 20, 23	1	80
Agarosio per biol. Mol. (1 Kg)		800	19, 20, 23	2	1.600
Reagenti specifici	Master mix per PCR	86	19, 20, 23,24	15	1.290
	Gene ruler, DNA ladder 100 bp	64	19, 20, 23,24	2	128
	Servizio di calibratura micropipette	75	20, 39	3	225
	Kit per estrazione DNA	1000	21, 24, 26,27	2	2.000
	Kit per Sybr PCR (500 reazioni)	300	22, 25, 36, 37, 38	6	1800
Primer & sequenze	Primer	5	28, 30, 32	150	750
	Sequenze	5	28, 29, 31	160	800
Ghiaccio & azoto	Ghiaccio secco e spedizione	50	33, 34, 35	6	300
	Azoto liquido (al lt.)	3.6	40	250	900
Totale					14.910

Tabella riassuntiva delle voci di spesa per tipologia

Voci di spesa	Costo previsto	IVA (22%)	Costo totale
Spese per personale	25.685	-	25.685
Spese missioni	3.400	-	3.400
Divulgazione	2.800	-	2.800
Predisposizione materiale divulgativo	4.000	880	4.880
Esecuzione di prelievi e analisi di laboratorio	11.920	2622	14.542
Acquisto beni (prezzi comprensivi di IVA)	14.910	-	14.910
Totale			66.217

Bibliografia

- Baldina S, Picarella ME, Troise AD, Pucci A, Ruggieri V, Ferracane R, Barone A, Fogliano V, Mazzucato A (2016) Metabolite profiling of Italian tomato landraces with different fruit types. *Front. Plant Sci.* 7:664. doi: 10.3389/fpls.2016.00664
- Ciancaleoni S, Chiarenza GL, Raggi L, Branca F, Negri V. Diversity characterisation of broccoli landraces for their on-farm (in situ) safeguard and use in breeding programs. *Genet Resour Crop Evol.* 2014; 61: 451–464.
- Lin T, Zhu G, Zhang J, Xu X, Yu Q, Zheng Z, Zhang Z, Lun Y, Li S, Wang X, Huang Z, Li J, Zhang C, Wang T, Zhang Y, Wang A, Zhang Y, Lin K, Li C, Xiong G, Xue Y, Mazzucato A, Causse M, Fei Z, Giovannoni JJ, Chetelat RT, Zamir D, Städler T, Li J, Ye Z, Du Y, Huang S (2014) Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. *Nature Genetics*, 46: 1220–1226. doi:10.1038/ng.3117, 2014
- Mazzucato A., Pepponi F., Chiocchia G. e Soressi G.P. (1998). Ricostituzione e valorizzazione della varietà locale di pomodoro Scatolone di Bolsena. *Italus Hortus*, Anno 5 n° 3: 30-35.
- Mazzucato A., Mosconi P., Siligato F., Picarella M.E., Soressi G.P. (2006). Caratterizzazione di varietà locali di pomodoro coltivate nella regione Lazio. *Italus Hortus* 13: 735-740.
- Mazzucato A, Papa R, Bitocchi E, Mosconi P, Nanni L, Negri V, Picarella ME, Siligato F, Soressi GP, Tiranti B, Veronesi F. (2008) Genetic diversity, structure and marker-trait associations in a collection of Italian tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces. *Theor Appl Genet* 116: 657-669
- Mazzucato A, Ficcadenti N, Caioni M, Mosconi P, Piccinini E, Sanampudi VRR, Sestili S, Ferrari V. (2010a) Genetic diversity and distinctiveness in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) landraces: The Italian case study of 'A pera Abruzzese'. *Scientia Horticulturae* 125: 55-62. DOI: 10.1016/j.scienta.2010.02.021
- Mazzucato A, Papa R, Negri V, Ferrari V, Ficcadenti N, Nanni L, Soressi GP, Veronesi F. (2010b). Caratterizzazione di varietà locali di pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.): dal genetista al consumatore. In: De Bellis L, Marchiori S, Miceli A (eds.) *La biodiversità – Risorsa per sistemi multifunzionali*. Atti dell'VIII Convegno Nazionale sulla Biodiversità, Lecce, 21-23 aprile 2008, pp. 263-265
- Nanni L, Bellucci E, Bitocchi E, Mazzucato A, Piermattei S, Porfiri O, Rossi M, Papa R (2005) La conservazione dell'agrobiodiversità nella Regione Marche. In: *Biodiversità e risorse genetiche; Assessorato Agricoltura e Sviluppo Rurale Regione Marche*, pp. 17-26.
- Ott A, Liu S, Schnable JC, Yeh C', Wang KS, Schnable PS. tGBS® genotyping-by-sequencing enables reliable genotyping of heterozygous loci. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(21):e178. doi:10.1093/nar/gkx853
- Paniconi G, Gianfilippi F, Mosconi P, Mazzucato A (2010) Distinctiveness of bean landraces in Italy: the case study of the 'Badda' bean. *Diversity* 2, 701-716; doi:10.3390/d2050701
- Raggi L, Tissi C, Mazzucato A, Negri V (2014) Molecular polymorphism related to flowering trait variation in a *Phaseolus vulgaris* L. collection. *Plant Science* 215-216: 180-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.11.001>
- Rao R, Caramante M, Blanco A, Lanteri S, Lucchin M, Mazzucato A. (2009) Innovazioni genetiche per l'identificazione e la protezione di prodotti tipici italiani. *Italian Journal of Agronomy* 3: S93-99.
- Sacco A, Ruggieri V, Parisi M, Festa G, Rigano MM, Picarella ME, Mazzucato A, Barone A (2015) Exploring a tomato landraces collection for fruit-related traits by the aid of a high-throughput genomic platform. *PLoS ONE* 10(9): e0137139. doi:10.1371/journal.pone.0137139
- Santangelo E., Mazzucato A., Picarella M.E., Mosconi P., Lioi L., Soressi G.P. (2006). Caratterizzazione del 'Fagiolo del Purgatorio' di Gradoli (VT). *Italus Hortus* 13: 496-502.
- Soressi G.P., Papalini P., Piccioni C., Santangelo E., Mosconi P., Picarella M.E., Mazzucato A. (2007). Innovazione varietale e programmazione culturale. In: *Atti del Convegno "Ricerca e innovazione per la valorizzazione del carciofo nella regione Lazio"*, Tarquinia (VT) 30 novembre 2007, pp. 12-23.
- Toricelli R, Tiranti B, Spataro G, Castellini G, Albertini E, Falcinelli M, Negri V. 2013. Differentiation and structure of an Italian landrace of celery (*Apium graveolens* L.): inferences for on farm conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60, 995–1006.

Viterbo, 19 dicembre 2019



Il responsabile scientifico
(Prof. Andrea Mazzucato)