

NUOVE STRATEGIE GENETICHE PER LA VALORIZZAZIONE DI ECOTIPI PIEMONTESI DI PEPERONE

Ezio PortisDISAFA - Genetica Agraria Università degli Studi di Torino







La coltura del peperone in Piemonte si estende su di una superficie di circa **500 ettari**

In coltivazione sono diffusi **ecotipi locali** di pregio riconoscibili a livello morfologico e dotati di una certa identità genetica

In particolare si stima che nel cuneese l'ecotipo "Cuneo" sia coltivato in **200 aziende** su una superficie complessiva di **quasi 100 ettari**.











Gli **ecotipi** in coltivazione sono il risultato di selezioni secolari per **l'adattamento a specifiche nicchie ecologiche**

Forniscono un prodotto dotato di caratteristiche organolettiche e sensoriali particolarmente apprezzate dai consumatori

Progressiva riduzione della loro diffusione e conseguente **erosione genetica**, in quanto non competitivi nei confronti delle nuove costituzioni varietali e ibridi F1









Lo sviluppo di **nuove tecniche di sequenziamento del DNA** (*NGS: next generation sequencing*) e lo sviluppo di approcci bioinformatici per analizzare i dati hanno rivoluzionato la ricerca nel campo della biologia applicata alle specie di interesse agrario



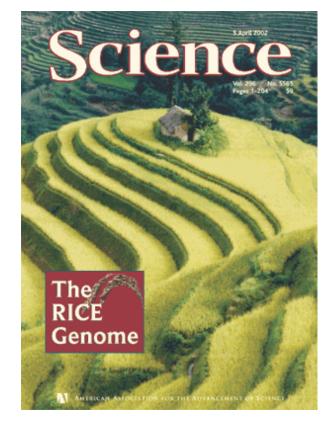


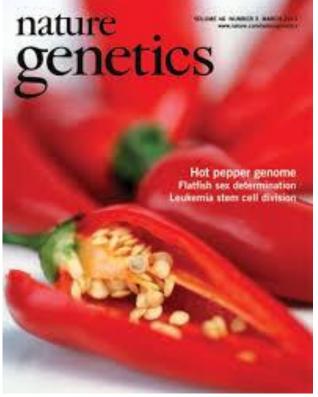


Sequenziare un genoma = Decodificare l'informazione genetica portata dal DNA

La prima specie sequenziata è stata il riso nel 2002, seguita da altre specie quali vite, patata, pomodoro ecc.

Sino ad arrivare alla disponibilità della sequenza del DNA di **peperone nel 2014**











- > Identificare geni che differenziano le diverse varietà/ecotipi coltivati
- ➤ Identificare geni che vengono espressi in risposta a stress di tipo biotico (funghi, batteri, virus, nematodi) e abiotico (carenza idrica, alte temperature, salinità del suolo)
- > Tracciare geneticamente una specifica varietà lungo la filiera produttiva





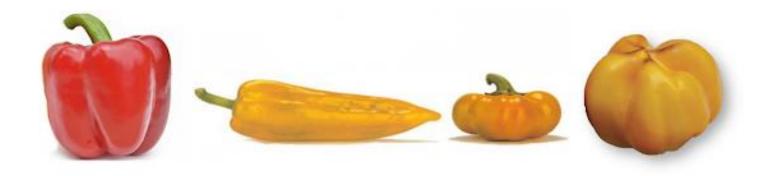
Progetto RisEPP

RISEQUENZIAMENTO DI ECOTIPI DI PEPERONE:

VALORIZZAZIONE DELLA QUALITÀ E TRACCIABILITÀ





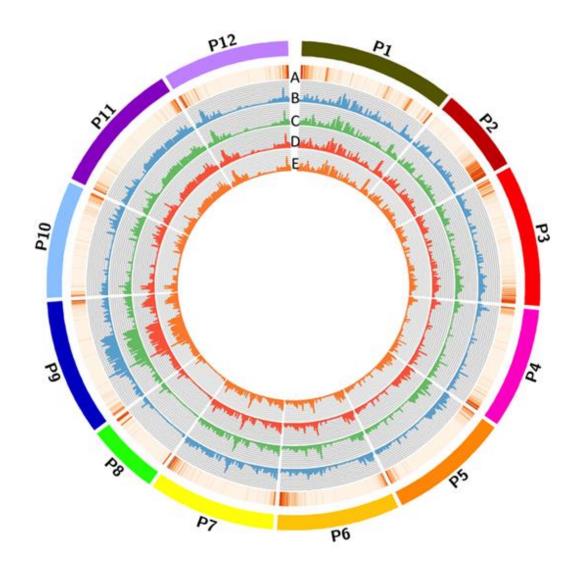




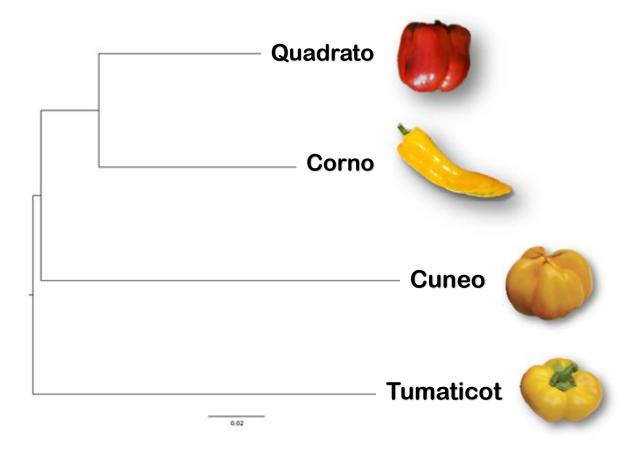


Progetto RisEPP RISEQUENZIAMENTO DI ECOTIPI DI PEPERONE: VALORIZZAZIONE DELLA QUALITÀ E TRACCIABILITÀ

- ➤ Ricostruire la sequenza del DNA dei quattro ecotipi piemontesi di peperone Identificare geni che le caratterizzano e i geni di resistenza e suscettibilità a patogeni
- ➤ Identificare differenze a carico del DNA che consentano di **tracciare i quattro ecotipi piemontesi lungo la filiera produttiva**, a salvaguardia del produttore e del consumatore
- ➤ Valutare, nell'ecotipo 'Cuneo', l'**effetto dello stress idrico** sia a livello genetico (attivazione nell'espressione di geni) che sulla qualità e quantità della produzione

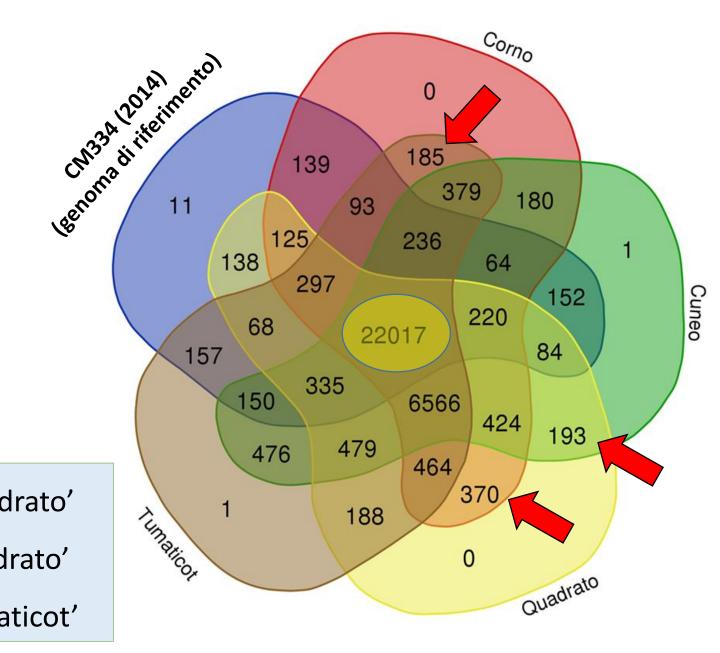


L'intera sequenza del DNA posizionata sui 12 cromosomi della specie



- 35.000 Geni
- 22.000 condivisi tra i 5 genotipi

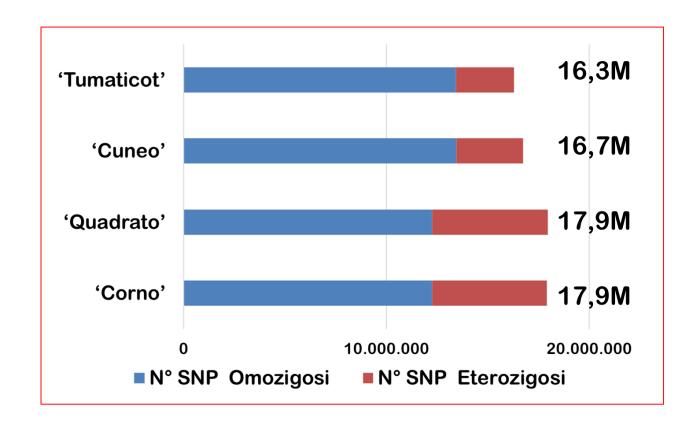
- 193 geni condivisi tra 'Cuneo' e 'Quadrato'
- 370 geni condivisi tra 'Corno' e 'Quadrato'
- 185 geni condivisi tra 'Corno' e 'Tumaticot'



Il confronto (allineamento) delle sequenze del DNA dei 4 ecotipi in studio con la sequenza di riferimento ha consentito di identificare circa **18 milioni di variazioni a carico di singoli nucleotidi del DNA** (SNPs = single nucleotide polymorphism)



Sviluppo di tecniche molecolari per tracciare i quattro ecotipi lungo la filiera produttiva



Analisi bioinformatiche allo scopo di identificare varianti alleliche presenti entro le principali

regioni genomiche coinvolte nella resistenza ai principali patogeni di peperone

Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV)

Tobamovirus spp. (TM)

Potato virus Y (PVY)







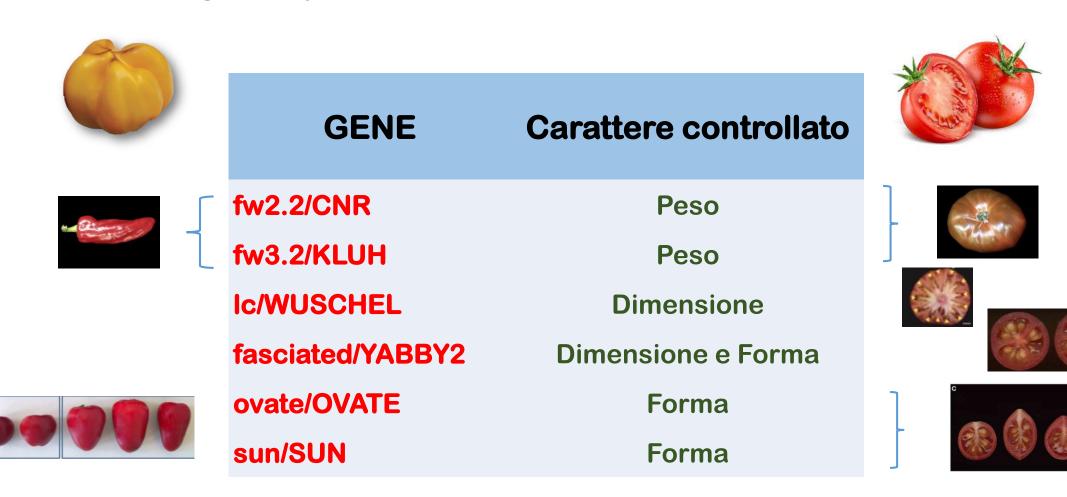
Phytophthora capsici Verticillium spp.





Attenzione concentrata sull'identificazione di **Geni di suscettibilità (S-genes)** una delle nuove frontiere del miglioramento genetico e per i quali sono in corso attività di ricerca per indurne la disattivazione mediante approcci basati sulle **NBT (New Breeding Technologies)**

Identificazione di geni responsabili della forma e della dimensione delle bacche



1) Prova di campo: piante coltivate secondo le normali pratiche colturali ed in condizione di stress idrico nel tunnel predisposto presso il Centro Sperimentale Orticolo dell'AGRION







1) Prova di campo: piante coltivate secondo le normali pratiche colturali ed in condizione di stress idrico nel tunnel predisposto presso il Centro Sperimentale Orticolo dell'AGRION

2) Prova sperimentale in ambiente controllato nelle serre in dotazione del DISAFA, allo scopo di tenere sotto controllo, in modo più accurato, le condizioni di stress idrico indotte



Identificazione di geni attivati in risposta allo stress

Prova sperimentale



Stress monitorato mediante misurazione con porometro della conduttanza stomatica (g_s)





$$g_s = 300 - 500 \frac{mmol}{m^2 \cdot s}$$

(massimo potere di ritenzione idrica del substrato)



$$g_s \approx 50 \; \frac{mmol}{m^2 \cdot s}$$

Stress idrico







Stress idrico

Recupero (recovery)

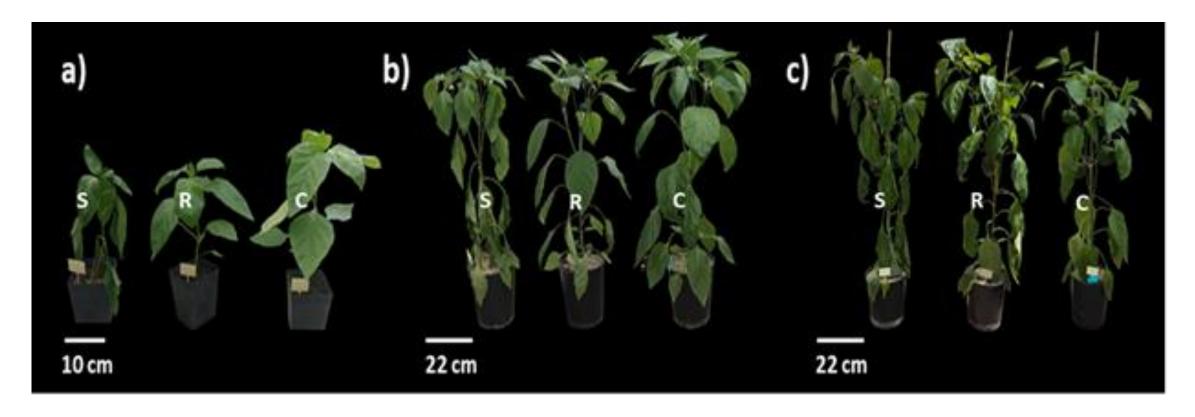
$$y_s \approx 50 \; \frac{mmol}{m^2 \cdot s}$$

$$g_s \approx 50 \; \frac{mmol}{m^2 \cdot s}$$
 \Rightarrow $g_s \approx 300 - 500 \; \frac{mmol}{m^2 \cdot s}$

Prova sperimentale

Tre stadi di sviluppo (x tre repliche)

- > a) produzione delle prime 5 foglie
- b) produzione del terzo fiore
- > c) produzione del primo frutto



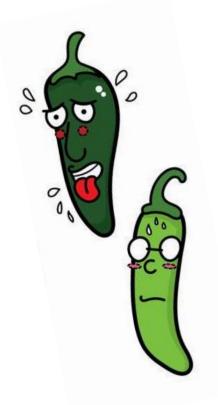
S = pianta sottoposta a stress - R pianta sottoposta a stress e successivo recupero (recovery) - C = pianta controllo

Prova sperimentale

Parametri morfologici e produttivi rilevati:

- (i) altezza della pianta
- (ii) lunghezza della prima biforcazione dello stelo
- (iii) diametro dello stelo

- (i) area fogliare
- (ii) dimensione del frutto
- (iii) peso del frutto
- (iv) spessore del pericarpo
- (v) compattezza del frutto



La fase di fioritura è risultata la più sensibile allo stress idrico



Cascola dei fiori

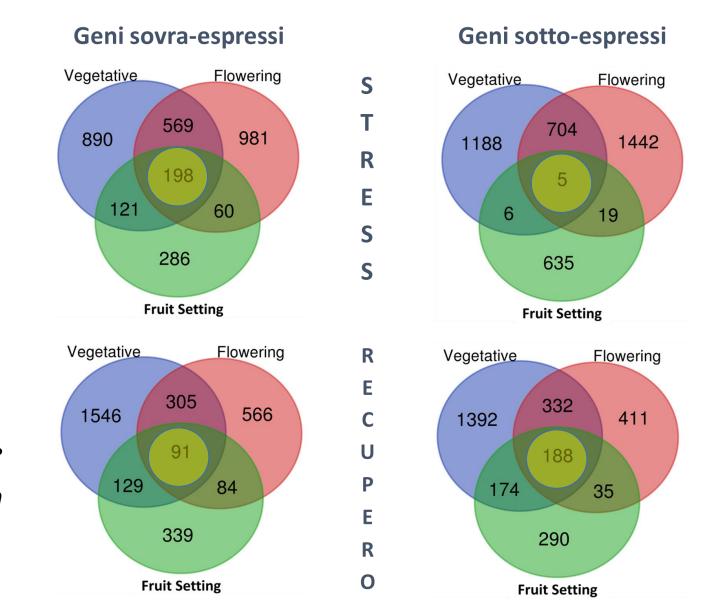
Riduzione numero e pezzatura delle bacche

Tuttavia la pianta di peperone ha nel complesso dimostrato una capacità di recupero rispetto allo stress idrico indotto nelle **prime fasi di sviluppo** della pianta e al momento dell'**allegagione** se questo è seguito da normale irrigazione

Analisi del Trascrittoma

(RNA, primo prodotto dei geni attivi)

La carenza di acqua induce l'attivazione e la repressione dell'espressione di un ampio numero di geni

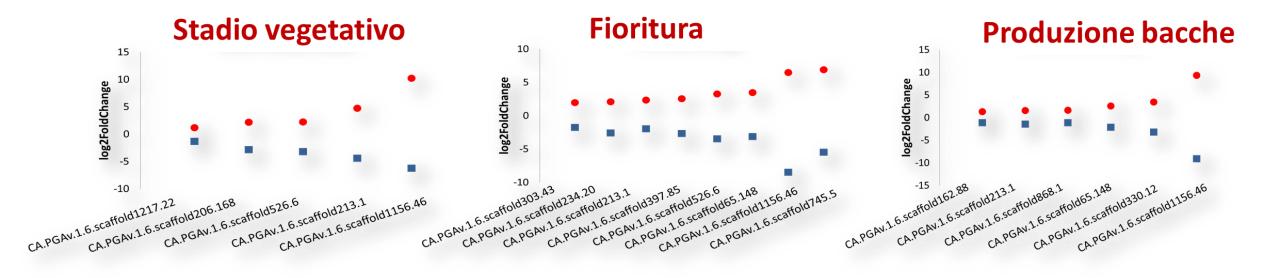


Analisi del Trascrittoma

(RNA, primo prodotto dei geni attivi)

Attivazione di geni definiti fattori di trascrizione

(TF = transcription factors)



Tali geni hanno la funzione di regolare l'espressione di altri geni e su di essi è possibile intervenire per incrementare la resistenza allo stress idrico nella specie.





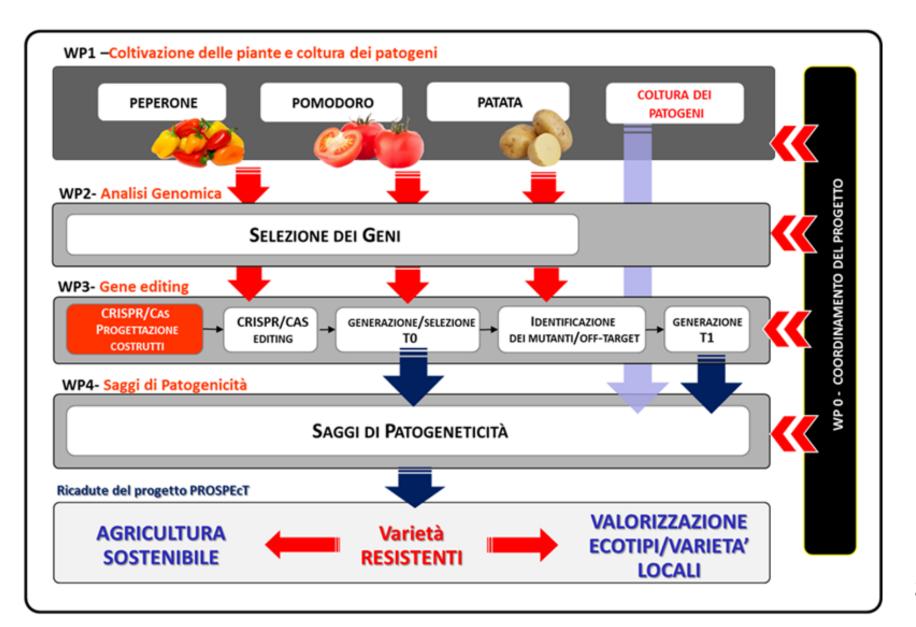
Progetto **PROSPEcT**

Nuove tecniche di MIGLIORAMENTO GENETICO per la PRODUZIONE di GENOTIPI RESISTENTI a PATOGENI in SPECIE di INTERESSE COMMERCIALE per il SETTORE ORTICOLO PIEMONTESE

- ➤ Mettere a punto la **tecnica CRISPR/Cas9** in patata, pomodoro e peperone
- Approfondire le conoscenze relative ai **Geni di suscettibilità** (SG) su due dei patogeni più distruttivi (peronospora e oidio) in tre specie di Solanacee chiave
- > Sviluppare **genotipi resistenti** a oidio e peronospora in pomodoro, patata e peperone, preservando la loro qualità commerciale e organolettica
- ➤ Ridurre **l'utilizzo di fitofarmaci** nella coltivazione di varietà commerciali di peperone, pomodoro e patata, rilevanti per il sistema agricolo piemontese, pur utilizzando le stesse varietà attualmente coltivate







Progetto **PROSPEcT**

Pathogen Resistance introduction in commercially important hOrticultural Species in PiEdmonT

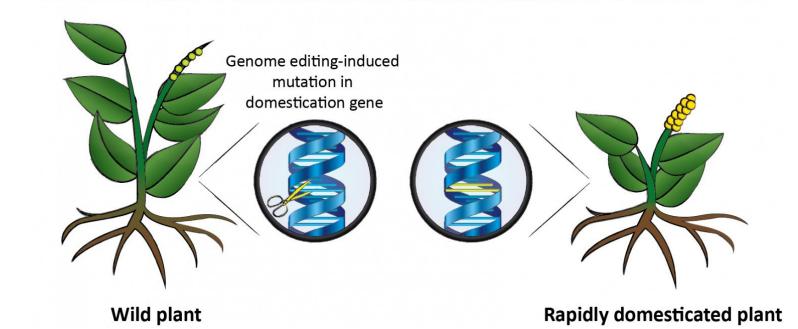
Processo di domesticazione

Spontaneous mutation in domestication gene

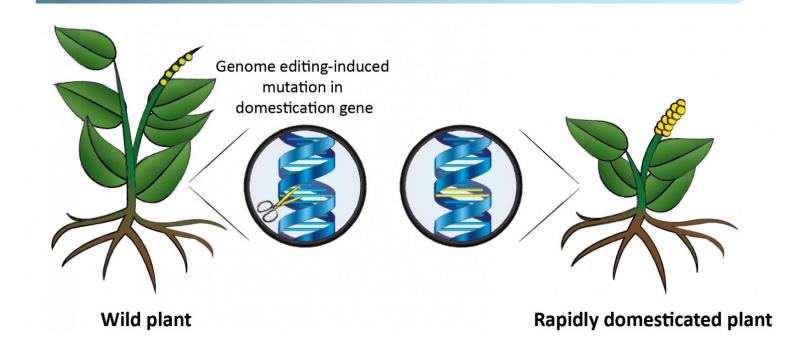
Ancestral crop

Modern crop

NBT (New Breeding Technologies)



NBT (New Breeding Technologies)



- ➤ Il **genome editing** consente di ottenere delle modificazioni, anche in una solo nucleotide del DNA della pianta, perfettamente identiche a quelle che si sarebbero potute produrre a seguito di mutazione naturale o a una lunga serie di incroci particolarmente fortunati.
- Utilizzato come strumento di mutagenesi biologica, consente mutazioni assolutamente puntuali
- ➤ Una varietà prodotta dal genome editing può essere del tutto identica a quella ottenuta con metodi di breeding tradizionali



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

Ezio PortisDISAFA - Genetica Agraria Università degli Studi di Torino



