L' ideotipo di cultivar e portinnesti di agrumi: obiettivi e strategie perseguibili

Alessandra Gentile e *Gaetano Distefano*

Dipartimento di Agricoltura, alimentazione e ambiente
Università degli studi di Catania

Contenuti della presentazione

- Origine e struttura delle specie vere e delle specie derivate
- Ruolo del breeding nella filiera produttiva
- Obiettivi del miglioramento genetico
- Ostacoli ai programmi di breeding basato su metodi convenzionali
- Metodi di miglioramento convenzionale: selezione clonale e incrocio

  - ✓ Mutazioni spontanee, chimere, selezione nucellare
  - ✓ Incroci
  - ✓ Mutagenesi indotta

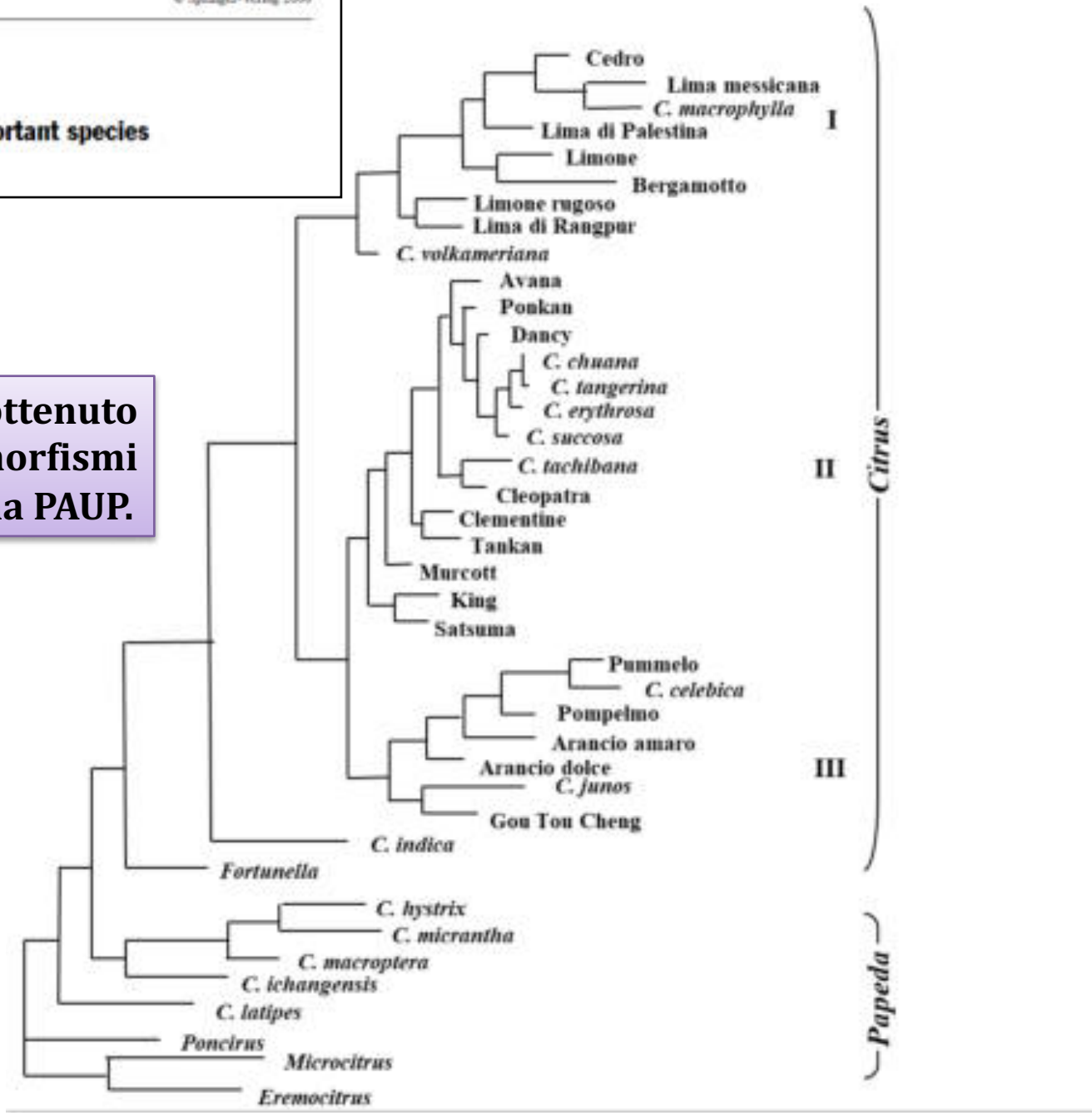
- Metodi biotecnologici per facilitare il breeding convenzionale
  - ✓ Coltura *in vitro* per NBT
  - ✓ MAS per caratteri di interesse
  - ✓ GWAS e genomic selection

Theor Appl Genet (2000) 100:1155–1166
© Springer-Verlag 2000

E. Nicolosi · Z.N. Deng · A. Gentile · S. La Malfa
G. Continella · E. Tribulato

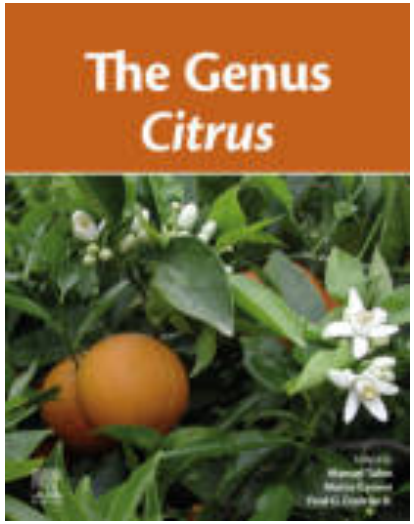
Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers

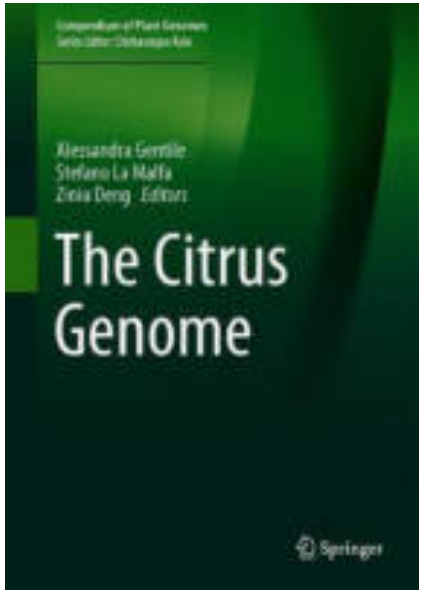
Albero filogenetico ottenuto dall'analisi dei polimorfismi RAPD e SCAR con il sistema PAUP.

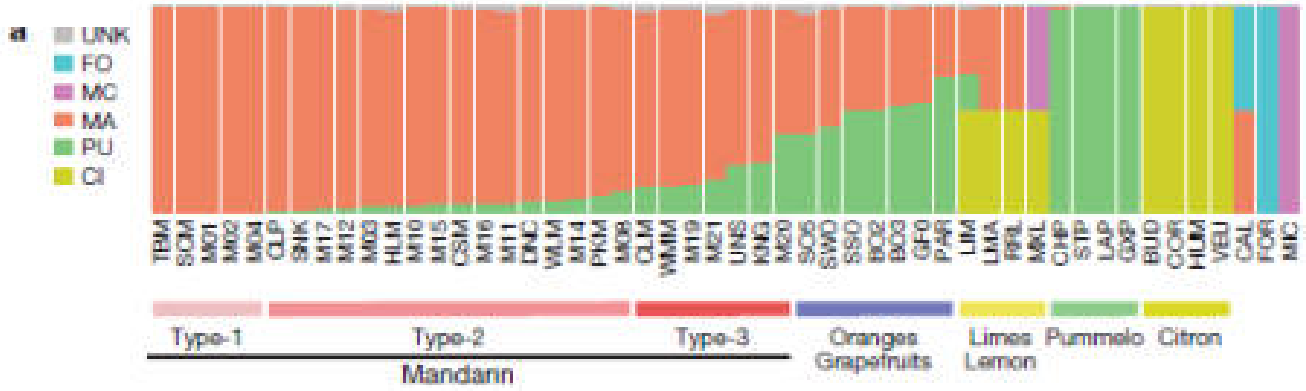


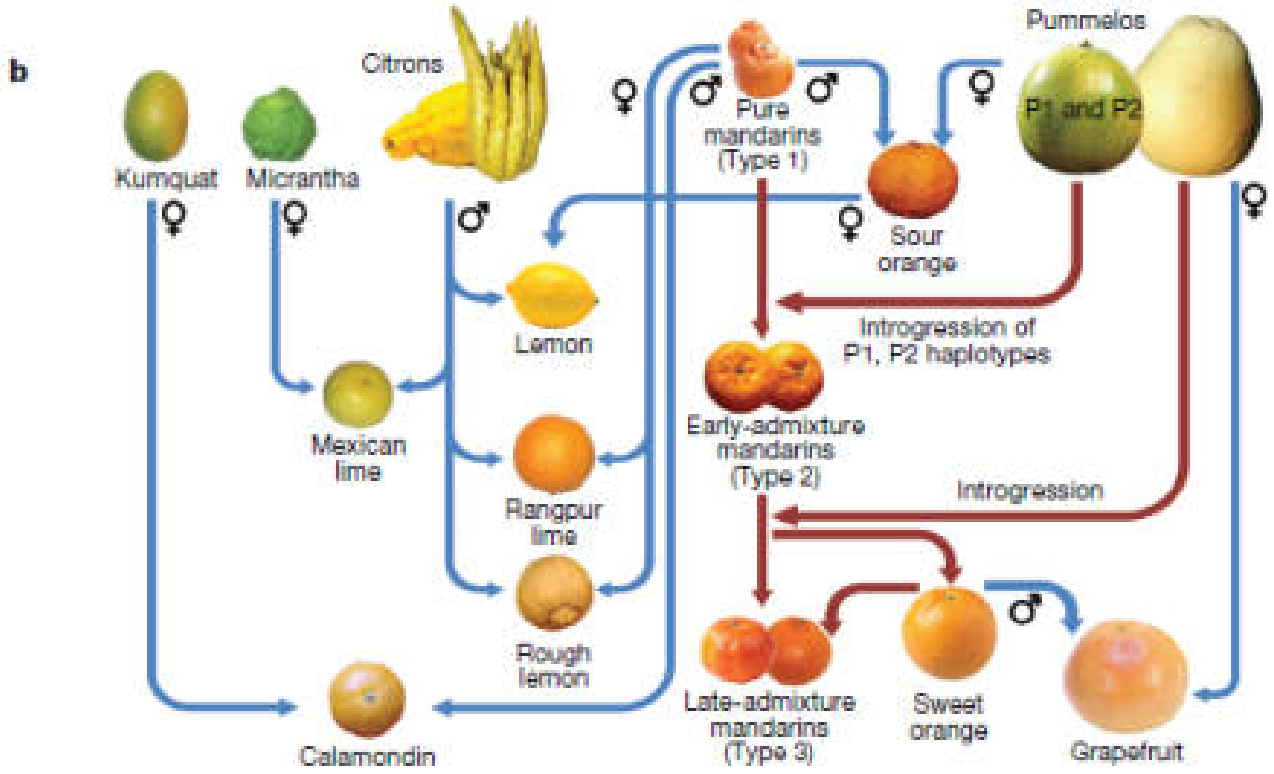
ARTICLE OPEN

Genomics of the origin and evolution of *Citrus*









Gli agrumi nel Mediterraneo

- **Cedro**: III-II secolo AC
- **Limone**: I secolo AC, X secolo
- **Arancio amaro** e **pummelo**: X secolo
- **Arancio dolce**: XIV e XV secolo
- **Mandarini**: XIX Secolo

Agrumi più recenti

Pompelmo
(Isole Barbados, XVIII secolo)

Clementine
(Algeria, ~1890)

In seguito all'introduzione delle specie di agrumi in Occidente, si è assistito al proliferare di centinaia di varietà coltivate, ottenute dalla selezione di nuovi **ibridi** (mandarini) e **mutanti naturali**

Esigenze di miglioramento genetico per gli agrumi 1/2

Presenza nelle diverse aree di coltivazione di vincoli di natura biotica e abiotica:

Nematodi,
Phytophtora sp.,
Citrus tristeza virus (CTV)

- Di larga diffusione
- Precludono l'utilizzo di alcuni portinnesti con buone caratteristiche e riducono produttività e qualità di specifiche varietà

Citrus canker
Citrus Variegated Chlorosis (Xylella)
Huanglongbing (ex greening)
Cercosporiosi
Mal Secco

- Specifiche di alcune aree
- Con assenza di fonti di resistenza
- Rischio di ulteriore diffusione

Esigenze di miglioramento genetico per gli agrumi 2/2

La presenza della coltura in ambienti con grande diversità e varietà di condizioni pedoclimatiche pone vincoli importanti

- Diminuzione e riduzione della qualità delle acque per uso irriguo
- Aumento della concentrazione delle precipitazioni
- Clorosi ferrica associata alla presenza di calcare e pH basico
- Eccessi termici

Il miglioramento delle caratteristiche qualitative dei frutti è oggi un obiettivo prioritario

Costanza della produzione

Pigmentazione

Resa in succo

Contenuto in determinate sostanze (Vitamina C, antocianine, …) e trasferimento ad altri settori

Riduzione della presenza di sostanze non utili (es. furanocumarine)

Diversificazione dell'epoca di maturazione

Maggiore resistenza dei frutti sull'albero

Prolungata shelf life

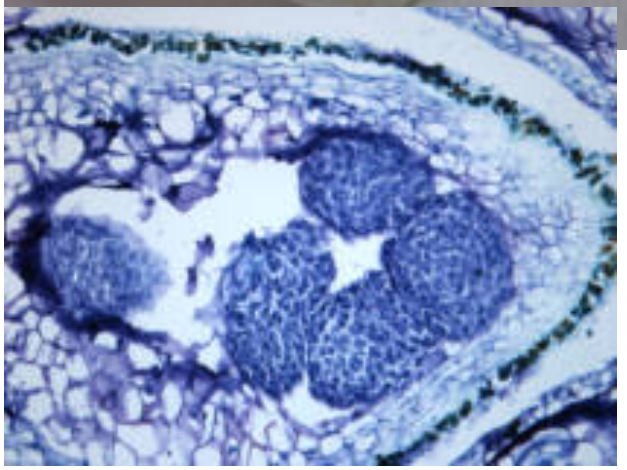
Assenza di semi (diversità e complementarietà di approcci)

Principali ostacoli al miglioramento genetico

- ✓Elevata eterozigosi
- ✓Apomissia
- ✓Sterilità maschile e/o femminile
- ✓Lunga fase giovanile (3-10 anni)

Apomissia

- ✓ Molti agrumi sono apomittici, e producono embrioni nucellari.
- ✓ Favorevole per i vivaisti. Permette di ottenere portinnesti omogenei (identiche alla pianta madre)
- ✓ **Sfavorevole per i breeder**
- ✓ **Utile per il risanamento**



Varietà sanguigne

VIII. — Tarocco (T. propriamente detto o T. dal muso — T. liscio o T. ovale o Calabrese sanguigno — Tarocchino).

IX. — Sanguinello comune o «sanguignu a pignu» (Sanguinello moscato e S. doppio moscato.)

X. — Sanguigno semplice.

XI. — Sanguigno doppio.

XII. — Doppio sanguigno Signorelli.

XIII. — Ovaletto sanguigno.

XIV. — Vaccaro.

XV. — Moro o selezionato o belladonna sanguigno.

XVI. — Sanguigno zuccherino.

XVII. — Sanguigni di spina o di «ariddu».

Nel 1935 Casella ha descritto 10 differenti varietà di arancio dolce

Sanguinello moscato

Sanguigno doppio

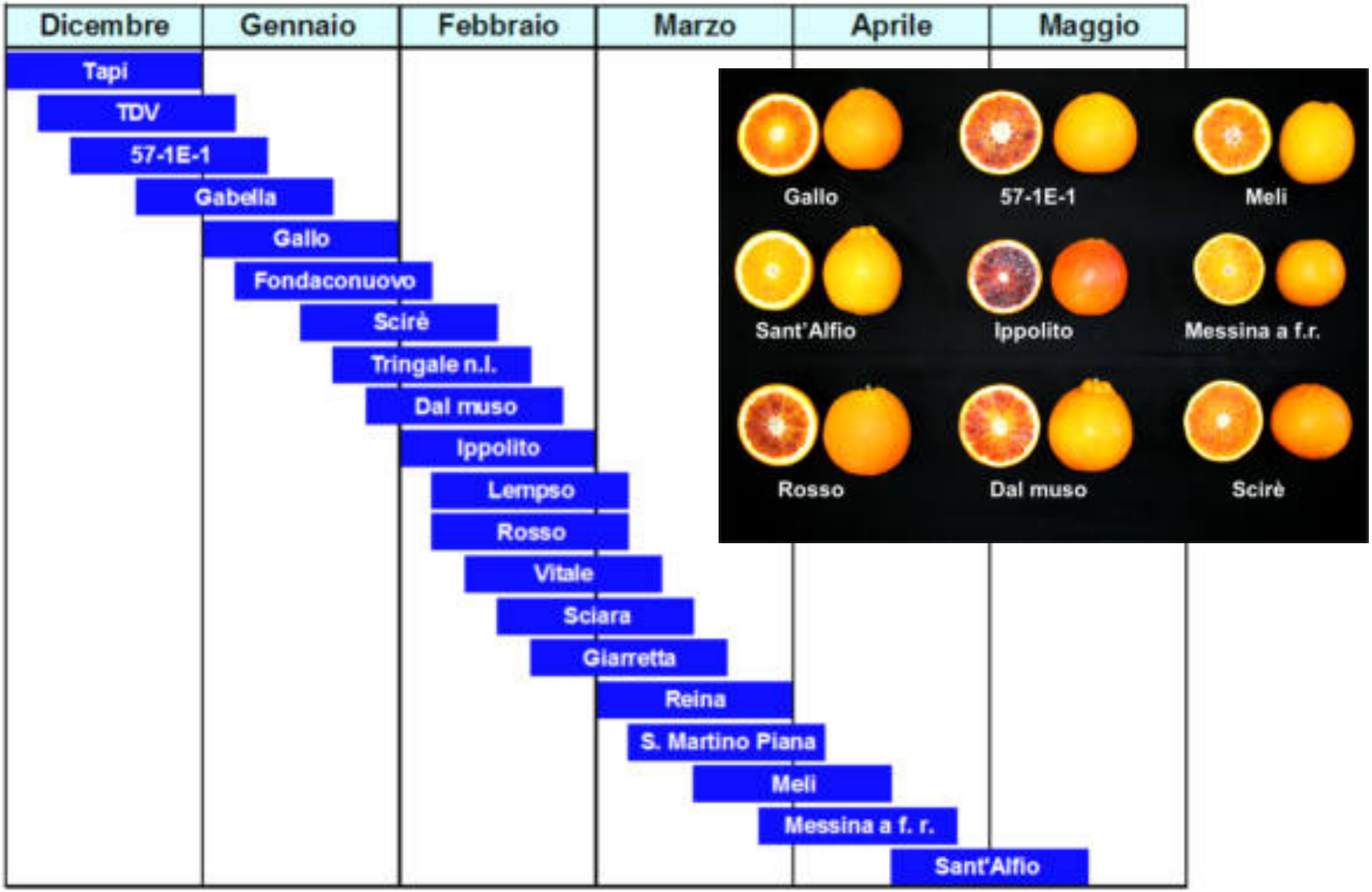
Vaccaro

Moro

Tarocco liscio

Arancio Tarocco

Calendario maturazione cloni di arancio Tarocco



Valutazione di un mutante di Tarocco Scirè

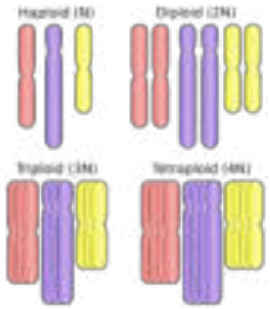
Valutazione di un mutante di Moro

Mandarino e mandarino-simili

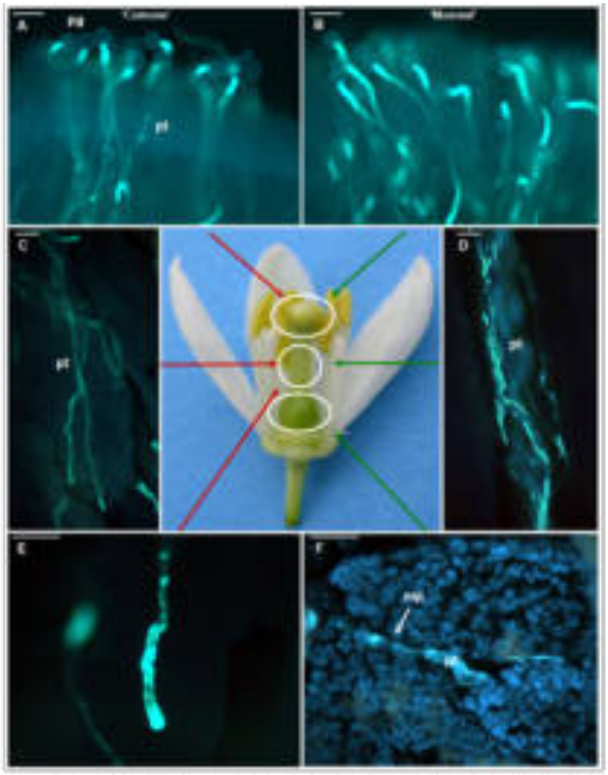
L’apirenia è diventata una caratteristica essenziale

Assenza di semi (diversità e complementarietà di approcci)

a) Costituzione individui triploidi

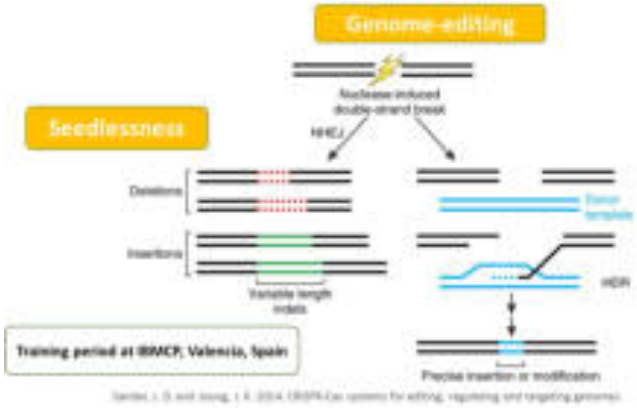


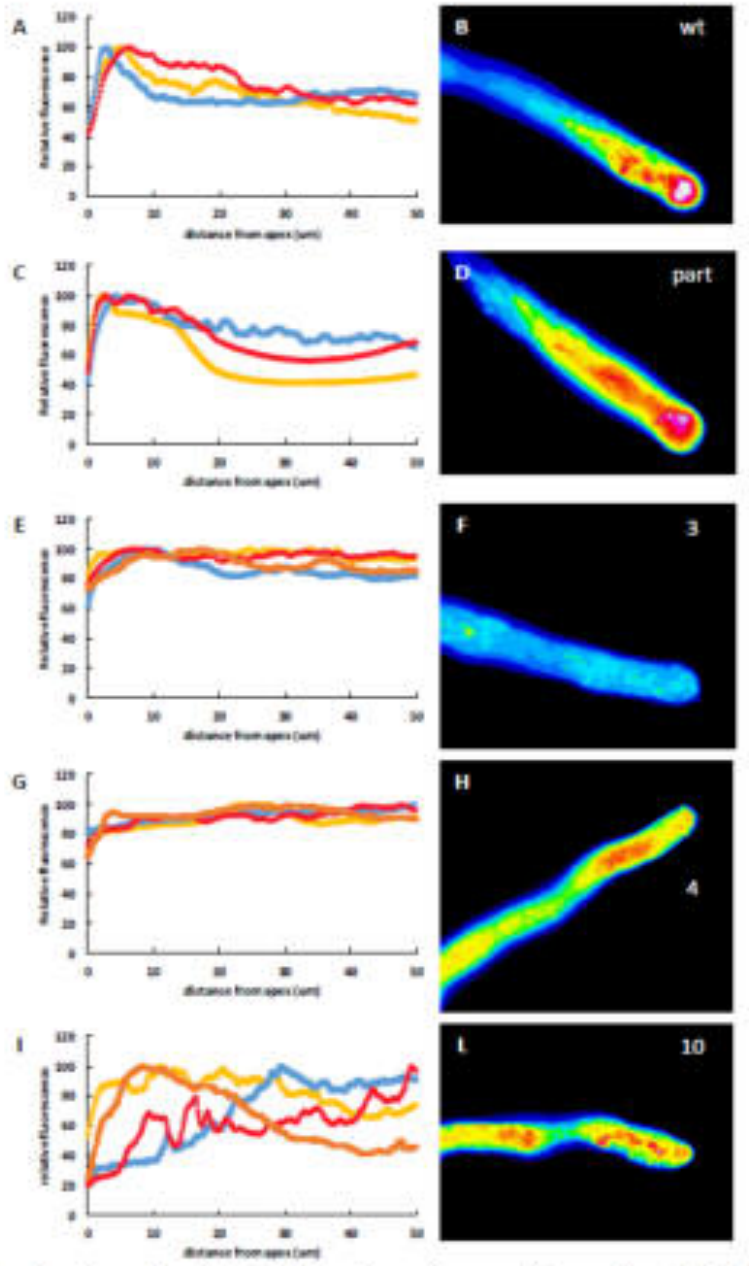
b) Studio del carattere «autoincompatibilità»



'Comune' clementine (SI) 'Monreal' clementine (SC)

c) «Knock out» di geni coinvolti nella formazione del seme

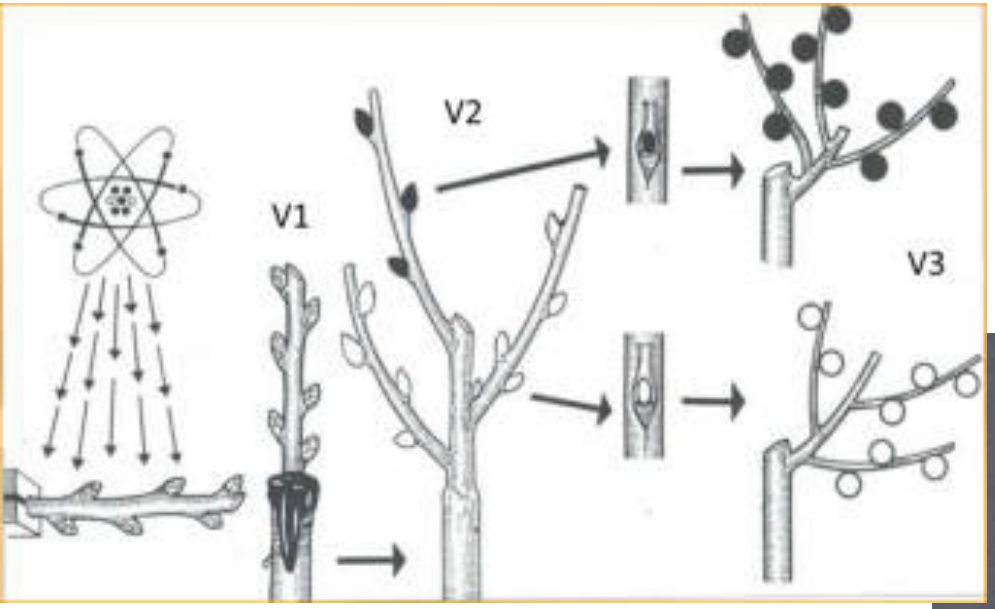




Distribuzione degli ioni calcio citosolico mediante Fluo-4/AM

Caratterizzazione funzionale del gene Asp-Rich

Sequenziamento dei mutanti naturali di clementine, Monreal e Mutante 3 per l'identificazione di polimorfismi associati all'auto-incompatibilità



Cami

("Comune" clementine x "Avana" mandarin) and the "Mapo" tangelo

Forte interesse a livello mondiale per il *mutation breeding*
(Star Ruby, Orri, Tango, Femminello Siracusano 2Kr)

Induzione di variabilità mediante irraggiamento

Limone Femminello Siracusano

Limone Chaparro

Mandarino Tardivo di Ciaculli

Mandarino Cami

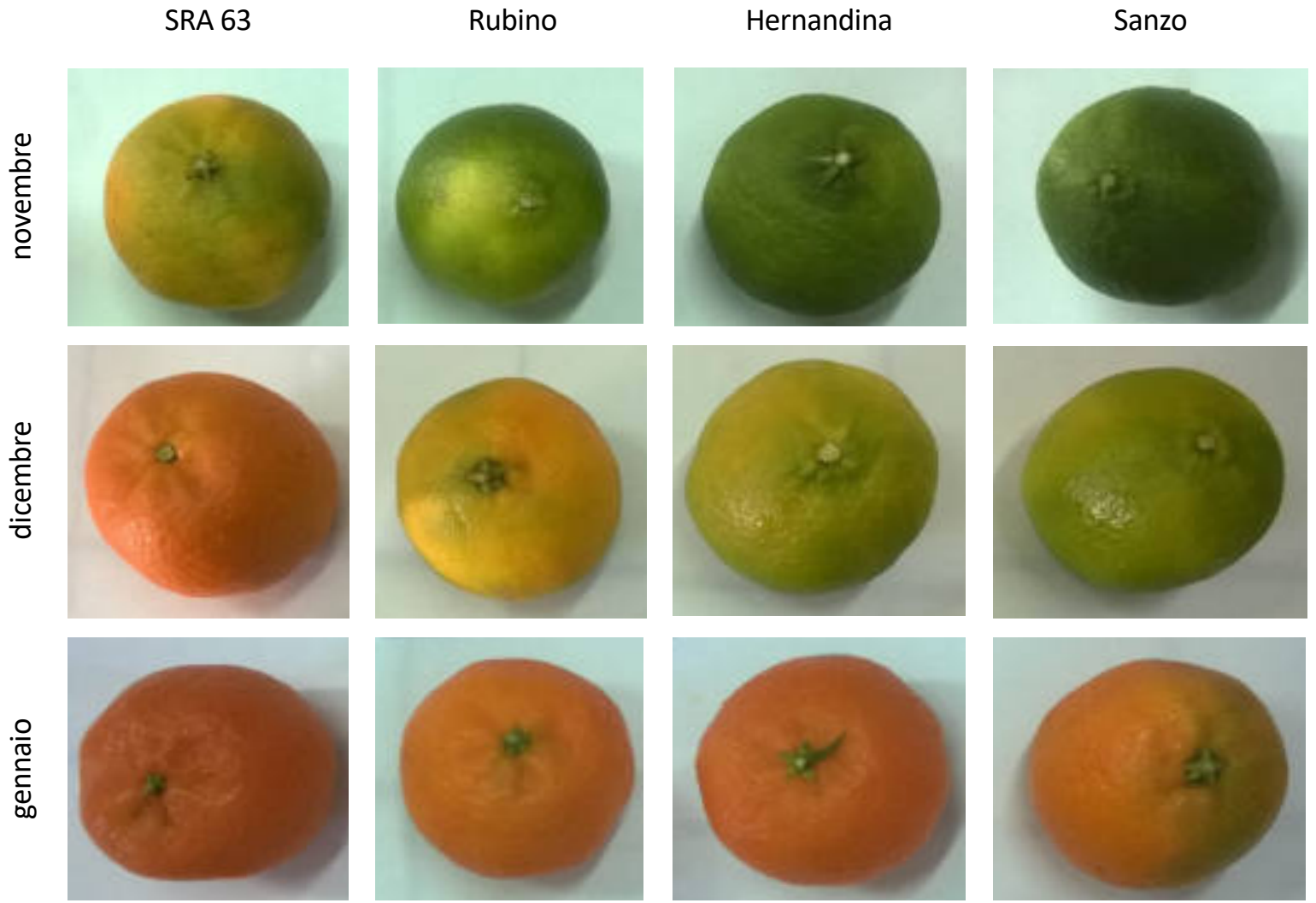
Tarocco Sant'Alfio

Irraggiamento Co^{60}

Rigenerazione per innesto

Preselezione massale

Clementine : epoca di maturazione



Attività di incrocio: Clementine x Primosole

L’interesse per questa specie è in ripresa

Il malsecco è un vincolo importante in molte aree

Nessuna selezione nuova (2Kr e Lemox sono comunque suscettibili)

Esigenza di allargare il calendario di commercializzazione prolungando la disponibilità con cultivar straniere
- con raccolta dal mese di settembre (Fino 95)
- con raccolta prolungata sino a maggio e giugno (Verna)

Possibilità di affrontare il problema malsecco dal punto di vista agronomico (protezione con reti)

Nuovi impianti e reinnesti di limone in aree, precedentemente arancicole, indenni da malsecco

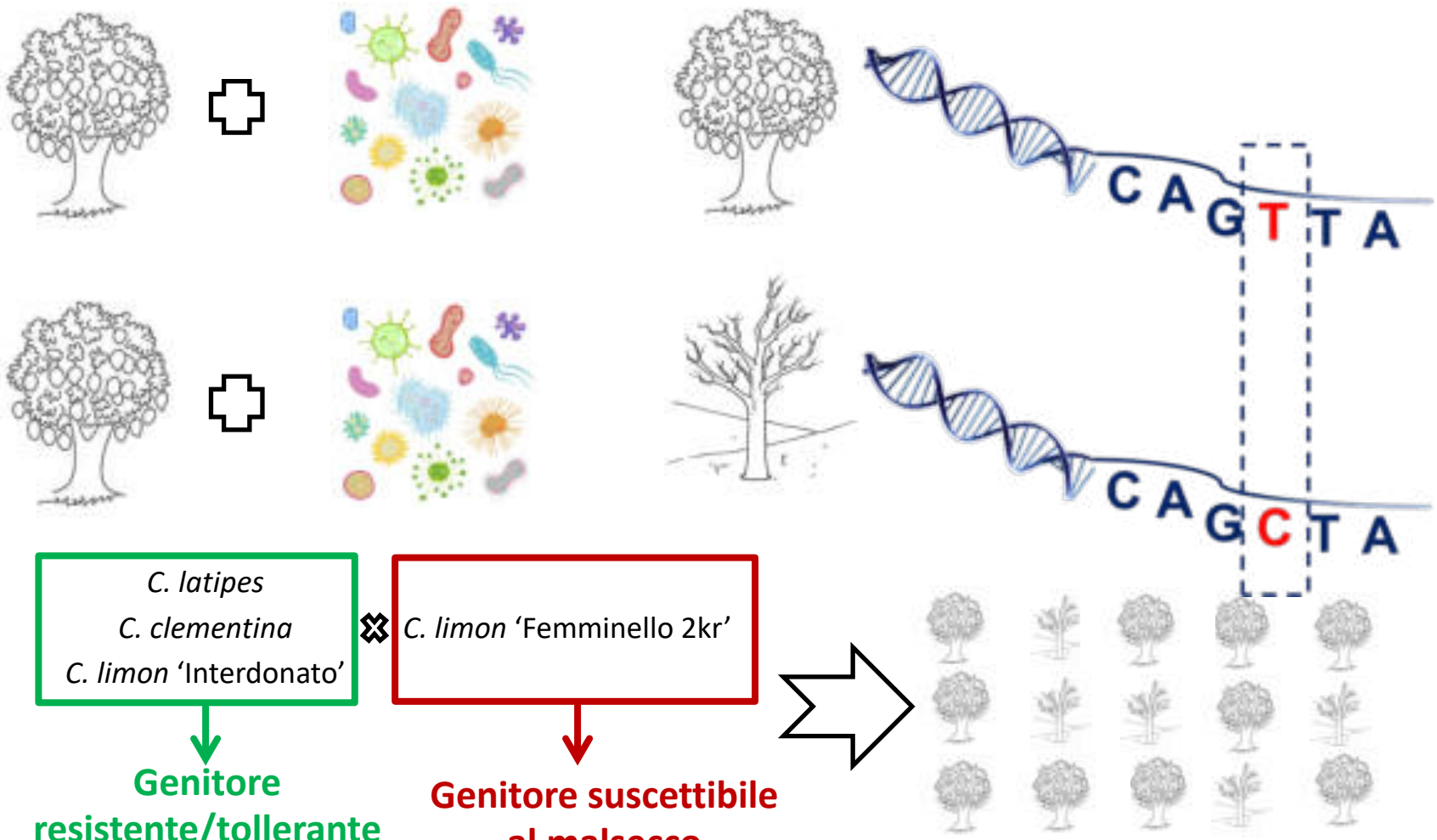
Ricerca della resistenza di origine genetica al malsecco

- Selezione clonale
- Ibridazione somatica
- Mutagenesi indotta
- Selezione cellulare
- Trasformazione genetica

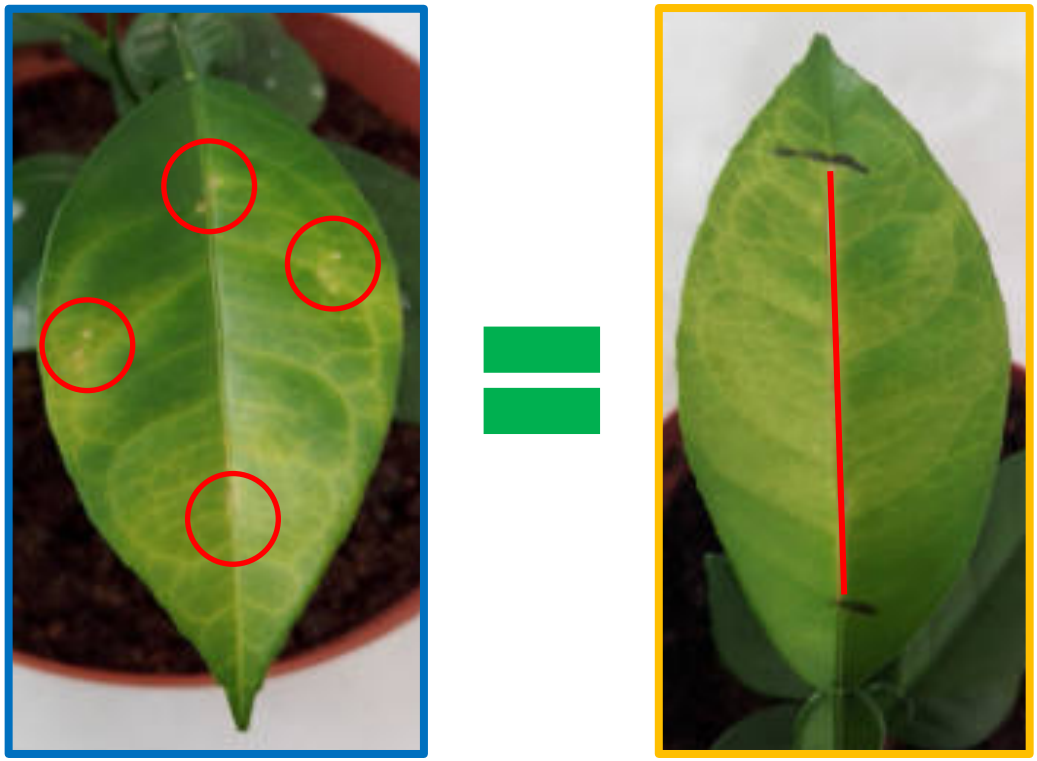
Resistenza genetica

Approccio biotecnologico (NGS):

- **Selezione dei parentali**
- **Costituzione di una popolazione segregante**
- **Caratterizzazione fenotipica**
- **Genotyping**
- **Analisi QTL**
- **MAS**
- **Selezione geni candidati**


C A G T T A
C A G C T A
C. latipes
C. clementina
C. limon 'Interdonato'
C. limon 'Femminello 2kr'
Genitore resistente/tollerante al malsecco
Genitore suscettibile al malsecco

Fenotipizzazione: metodo di inoculo e valutazione dei sintomi



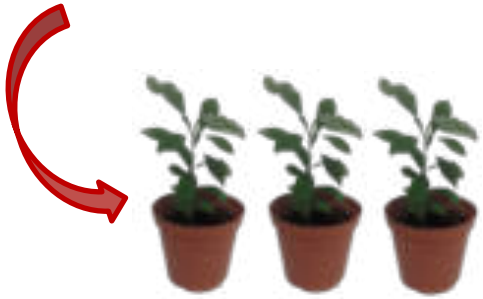
Salerno and Catara, 1967

Incrocio controllato e propagazione

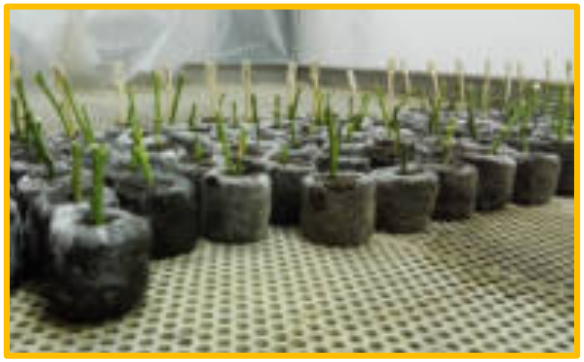
Semenzali

Popolazione

Propagazione in vitro

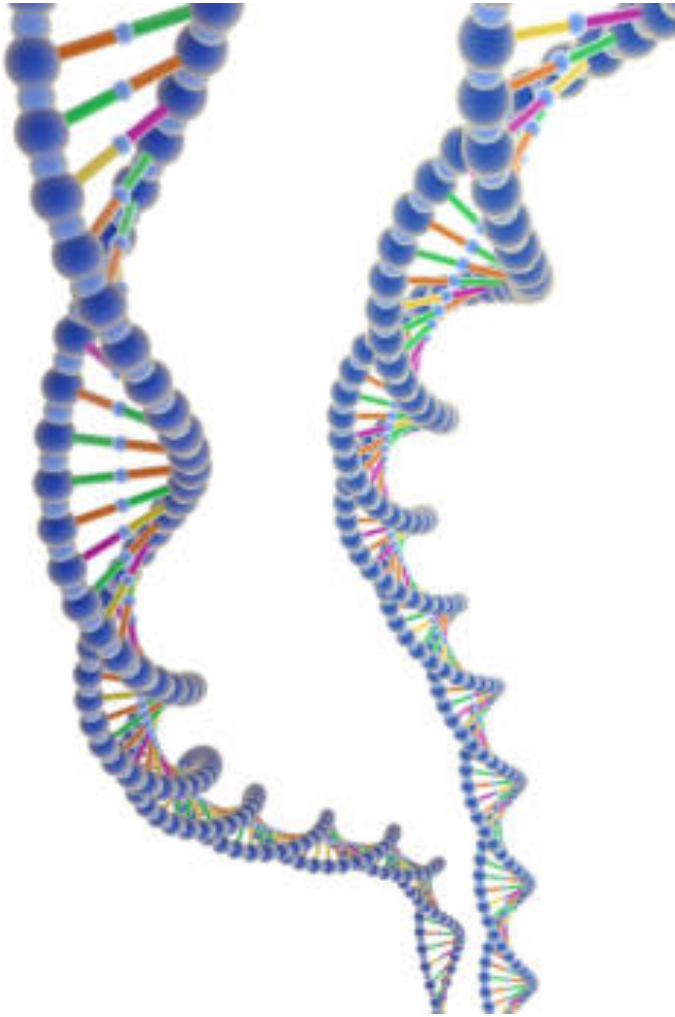


Propagazione per talea



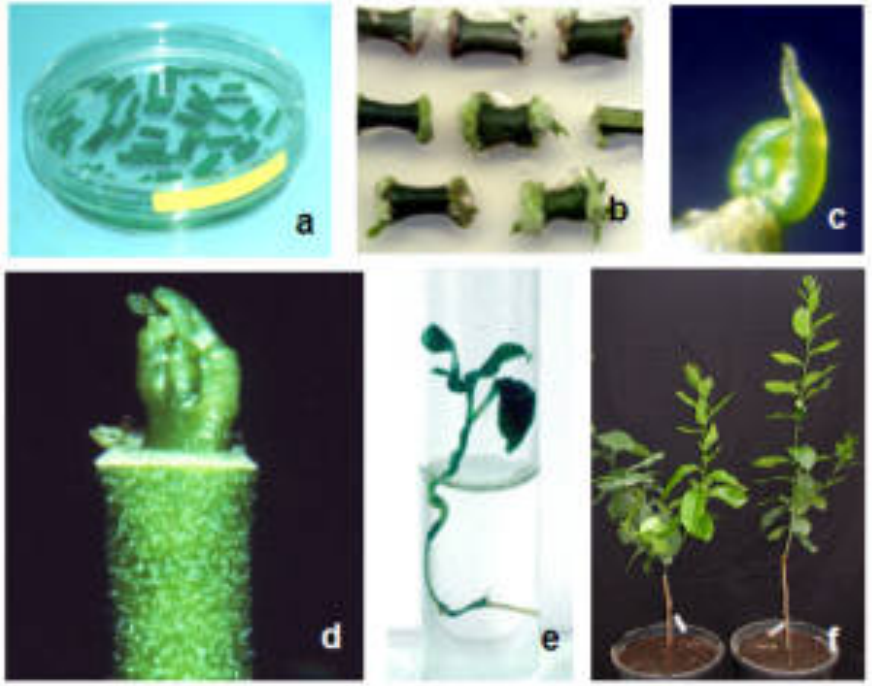
De novo assembly
Genoma di limone di riferimento

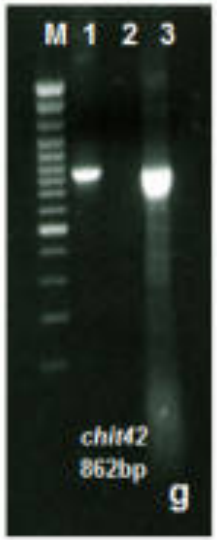
- **Cultivar: ‘Femminello siracusano’**
- **Sequencing technology**
  - **Illumina paired end 150 (coverage 100X)**
  - **Oxford Nanopore technology (coverage 100X)**
- **Dimensione del genoma: 360.8 Mb**
- **Annotazione funzionale dei geni (36.000) da RNA estratto da (foglie, fiori, frutto, radice)**

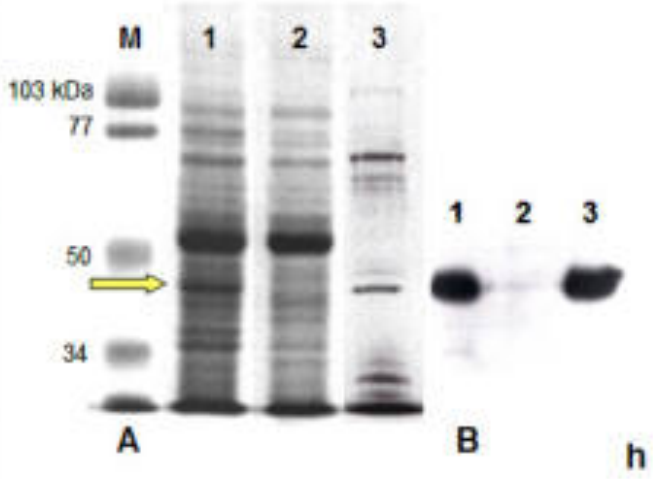


Costituzione di piante di limone transgeniche

- Obiettivo generale
costituzione di cloni di limoni resistenti a patogeni fungini e con buone caratteristiche qualitative
- Cultivar utilizzata
"Femminello siracusano"
- Metodo di trasformazione
indiretto, mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, ceppo EHA105 (particolarmente virulento per gli agrumi)
- Gene introdotto
chit42 (endochitinasi di *Trichoderma harzianum*)
- Agente di selezione
kanamicina (alla concentrazione di 100 mg/l)
- Fasi della trasformazione
infezione, cocoltura, rigenerazione e selezione, microinnesto delle gemme putative transgeniche
- Verifiche molecolari
PCR, RT-PCR, Southern blot, Northern blot, Western analysis



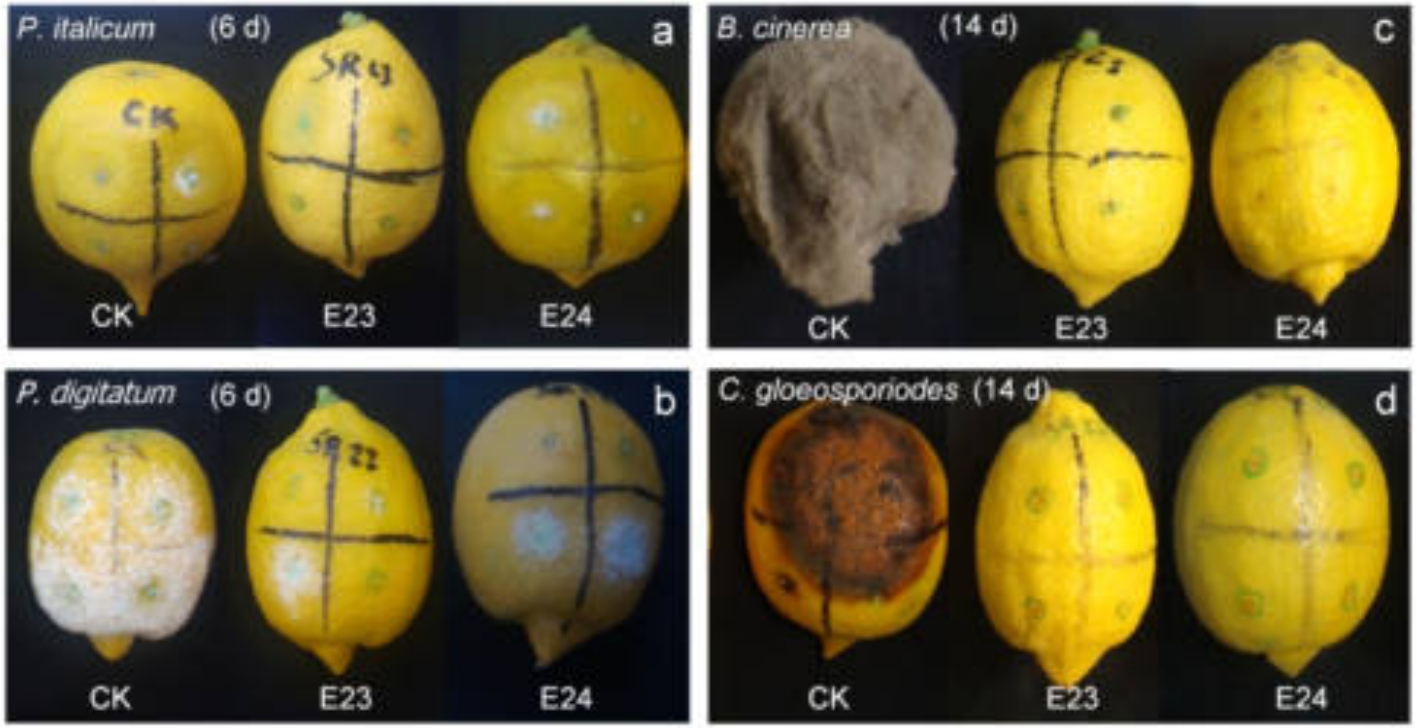




Resistenza dei frutti di limone transgenico a patogeni fungini

Lemon Fruits from Endochitinase Transgenic Plants Exhibit Resistance against Postharvest Fungal Pathogens

Cinzia Oliveri[1], Gaetano Distefano[1], Stefano La Malfa[1,*], Rosa La Rosa[1], Ziniu N. Deng[2] and Alessandra Gentile[1]
[1]Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), Catania, Italy
[2]Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Hunan, China
*Corresponding author: slamalfa@unict.it



Proc. XII[th] Intl. Citrus Congress
Eds.: B. Sabater-Muñoz et al.
Acta Hort. 1065, ISHS 2015

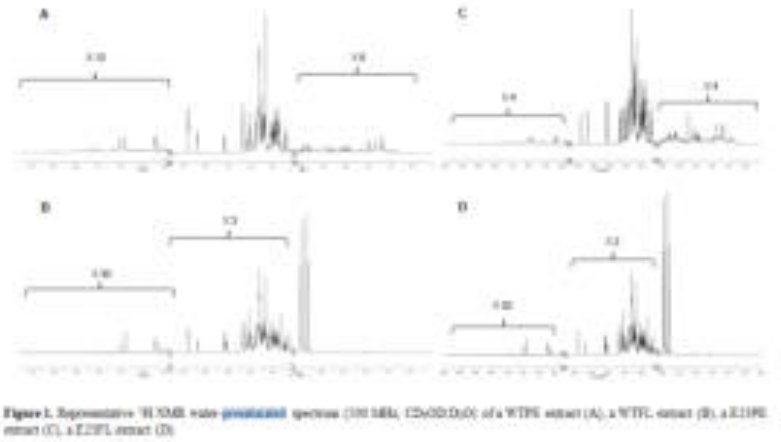
Journal of Agricultural and Food Chemistry (2020)

Substantial Equivalence of Transgenic Lemon Fruit Showing Postharvest Fungal Pathogens Resistance

Vera Muccilli, † ,∇ Alessandro Vitale,‡,∇ Ling Sheng,§ Alessandra Gentile,‡,§,* Nunzio Cardullo † Corrado Tringali, † Cinzia Oliveri,‡ Rosa La Rosa,‡ Mario Di Guardo,‡ Stefano La Malfa,‡ ZiniuDeng,§ Gaetano Distefano‡

† Department of Chemical Sciences, University of Catania, 95125-Catania , Italy
‡ Department of Agriculture, Food and Environment, University of Catania, 95123-Catania, Italy
§ College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, 410128-Changsha, China

Analisi con la risonanza magnetica nucleare (NMR) del metaboloma della buccia e della polpa dei frutti, dimostrano la **sostanziale equivalenza** dei profili del frutto OGM, resistente ai patogeni fungini e del frutto del clone di controllo



Obiettivi per i portinnesti

- Tolleranza a Citrus tristeza virus (CTV)
- Adattabilità a terreni calcarei e salini
- Taglia ridotta e precoce entrata in produzione
- Qualità delle produzioni: pigmentazione per arancio dolce

Nuovi portinnesti

Bitters

Carpenter

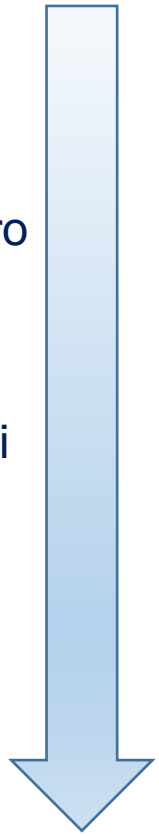
Furr

Propagazione in vitro dei portinnesti

Permette di propagare clonalmente anche portinnesti monoembrionici o scarsamente poliembrionici

Tecniche di miglioramento genetico

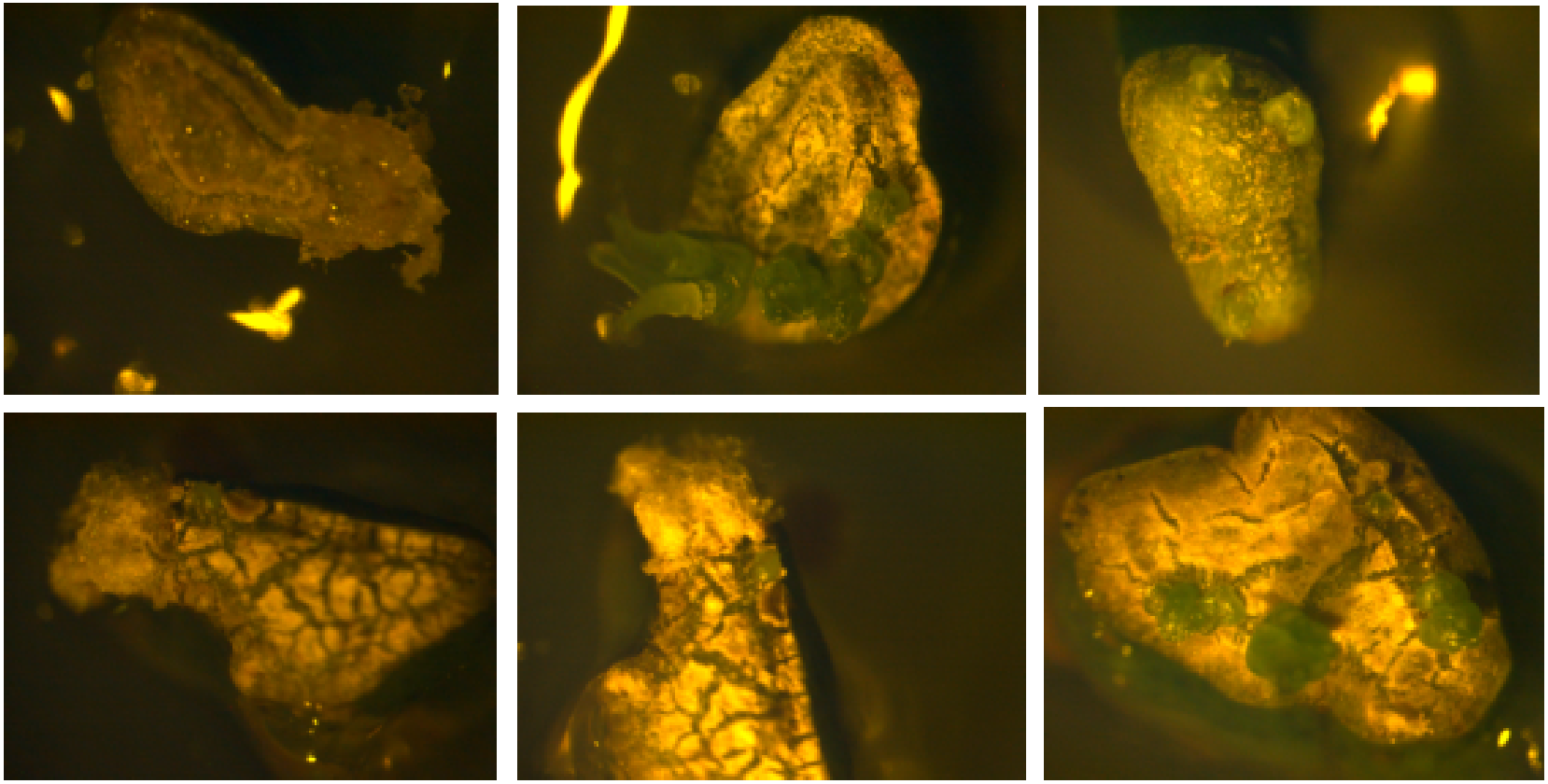
- ibridazione intra- e inter-specifica
- selezione clonale
- selezione nucellare
- introduzione di germoplasma straniero
- variazione della ploidia
- mutazioni indotte
- selezione *in vitro* di callo e protoplasti
- ibridazione somatica
- c-ibridazione
- trasformazione genetica
- cisgnesi
- genome editing



Progressiva maggiore importanza dell'utilizzo di tecniche di coltura in vitro e di dati molecolari (dalla MAS all'utilizzo della genomica)

Citrus Slices Rigeneration

10° week Clementine



La (falsa e inutile) contrapposizione tra metodi tradizionali e innovativi

- Integrazione delle tecniche
- Esigenza di conoscenza delle informazioni sull'ereditarietà e non solo
- E' il momento di capitalizzare le informazioni che provengono dal sequenziamento dei genomi (e di investire per quelli che mancano)