

OFFERTA TECNICO ECONOMICA

**ATTIVITA' DI SCREENING DI UNA POPOLAZIONE TILLING DI POMODORO E STUDIO DEL FENOTIPO
ATTRAVERSO IMAGING DI PUTATIVI MUTANTI INDIVIDUATI**

Titolo del progetto: RE-VOC

CUP progetto: B53D23032030001

Codice del progetto: P20229ZW4A

Oggetto: L'offerta riguarda l'esecuzione di: 1) attività di forward genetics, basata sul fenotipo, per l'individuazione di putativi mutanti della risposta a induzione da VOC e 2) lo studio del fenotipo dei potenziali mutanti individuati attraverso approcci di plant phenotyping by imaging. Per convenienza tecnica e gestionale amministrativa l'attività è suddivisa in due lotti corrispondenti a punti precedenti.

LOTTO 1

APPROCCI DI FORWARD GENETICS PER L'INDIVIDUAZIONE DI PUTATIVI MUTANTI DELLA RISPOSTA AI VOC ATTRAVERSO SCREENING MASSALE SULLA POPOLAZIONE TILLING DI POMODORO CV. RED SETTER.

L'attività ha lo scopo di individuare putativi mutanti della risposta ai VOC, attraverso uno screening massale basato sul fenotipo di mutanti di pomodoro indotti da mutagenesi chimica (EMS), appartenenti ad una popolazione predisposta per approcci TILLING. Lo studio del fenotipo sarà condotto mediante imaging nel visibile (RGB), con una piattaforma realizzata ad hoc, su sementali che conterranno i mutanti.

LOCALIZZAZIONE: L'attività sarà condotta presso il Centro Ricerche Metapontum Agrobios di ALSIA.

Attività:

Le attività che saranno eseguite sono le seguenti:

- 1) Germinazione ed allevamento delle plantule di mutanti in germinatoi (plateaux)
- 2) Applicazione dello stress idrico sulle plantule
- 3) Priming delle plantule con VOC, utilizzando piante di pomodoro che emettono VOC (emitters), sottoposte a stress idrico.
- 4) Imaging in RGB mediante sensori TOP
- 5) Estrazione dei traits ed analisi dei dati
- 6) Individuazione dei putativi mutanti di interesse
- 7) Allevamento dei putativi mutanti e produzione seme

MATERIALI

Popolazione TILLING: ALSIA metterà a disposizione delle attività la popolazione TILLING di pomodoro cv. Red Setter (Minoia et al., 2010), costituita da 5200 famiglie di semi M3.

SET-UP SPERIMENTALE

La semina delle famiglie mutanti M3 verrà fatta in seminiere di 18 pozzetti/alveoli disposti in 3 file per 6 colonne. In ciascuna seminiera saranno seminate due diverse famiglie di mutanti M3. Mentre il genotipo di controllo, RS (Red Setter), sarà seminato con un totale di 18 semi per seminiera.

Per ragioni logistiche, si procederà in batch con la semina delle famiglie M3 in più cicli. Per ogni ciclo saranno seminati 388 famiglie mutanti di pomodoro M3, ciascuna rappresentata da 9 semi. Ogni batch è costituito da

194 seminiere. Le seminiere saranno distribuite in due box di crescita, ciascuno di 36 m² (6m x 6m), contenenti 100 seminiere di cui 97 di famiglie mutanti e 3 di controllo RS.

Si prevede di effettuare almeno due cicli di semina (????). Il numero di batch analizzati sarà funzione dei risultati ottenuti nei batch già eseguiti in termini di numero di mutanti identificati considerati accettabili.

1) Germinazione ed allevamento delle plantule di mutanti in germinatoi (plateaux)

Procedura di Germinazione:

- Pregerminazione: I semi saranno posti in pregerminazione per 24 ore in camere di crescita, con condizioni standardizzate.
- Dopo la pregerminazione, i semi saranno trasferiti nei vassoi manualmente.

Condizioni di Crescita:

- Temperature: Le piantine saranno coltivate a una temperatura di 24°C durante il giorno e 18°C durante la notte, con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio.
- Irrigazione: Durante la fase di attecchimento e crescita iniziale, l'irrigazione sarà mantenuta al 100% della Capacità Idrica di Campo (CIC). Successivamente, sarà applicato uno stress idrico sospendendo l'irrigazione.

2) Applicazione dello stress idrico sulle plantule

- Lo stress idrico sarà indotto sospendendo l'irrigazione delle seminiere, con una registrazione regolare della perdita di peso.
- Monitoraggio: Il peso delle seminiere sarà monitorato con un esperimento pilota per valutare la perdita di acqua.

3) Priming delle plantule con VOC, utilizzando piante di pomodoro che emettono VOC (emitters), sottoposte a stress idrico.

3.1) Preparazione delle Emitters per il priming VOC

Una settimana prima della semina dei mutanti, sarà effettuata la semina delle piante destinate a diventare emitters. Queste piante saranno coltivate in un box separato per evitare qualsiasi contatto con le piantine mutanti prima della loro applicazione. Le emitters saranno piante di pomodoro della cultivar Red Setter. Quando avranno raggiunto lo stadio di 5-6 foglie vere, le piante emitters, coltivate in vasi da 3 litri, saranno trasferite nei box contenenti le seminiere dei mutanti, in un numero di 25 piante per box, con un rapporto di una pianta emitter ogni quattro seminiere.

Dopo il posizionamento nei box, inizierà la sospensione dell'irrigazione per le piante emitters. Queste piante saranno monitorate giornalmente con un porometro per verificare l'inizio dello stress idrico, evidenziato da una riduzione della conduttanza stomatica. Quando le emitters raggiungeranno uno stato di stress, indicato da una conduttanza stomatica di circa +/- 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, sarà avviata la sospensione idrica anche per le seminiere contenenti i mutanti. Durante l'applicazione dello stress idrico, saranno effettuati scatti nello spettro del visibile in Top View.

4) Imaging in RGB mediante sensori TOP

Per la realizzazione delle immagini scattate in Top View della seminiera e più in generale per analizzare ingenti moli di dati di tipo immagine di un certo numero di piante fatte crescere nelle seminiere in serra, è stato

progettato e realizzato un sistema per l'acquisizione rapida e standardizzata di immagini a colori (Figura 1), ad alta risoluzione, con vista dall'alto, comprendente l'integrazione dei seguenti materiali:

- Telecamera DALSA GENIE NANO XL G3-GC30-C5105 da 25 megapixel
- Ottica Zeiss Milvus 21mm
- Alimentazione PoE
- Struttura di sostegno ad-hoc realizzata con barre Bosch
- Illuminazione LED
- Fondo e pareti scure
- Pc per acquisizione dati

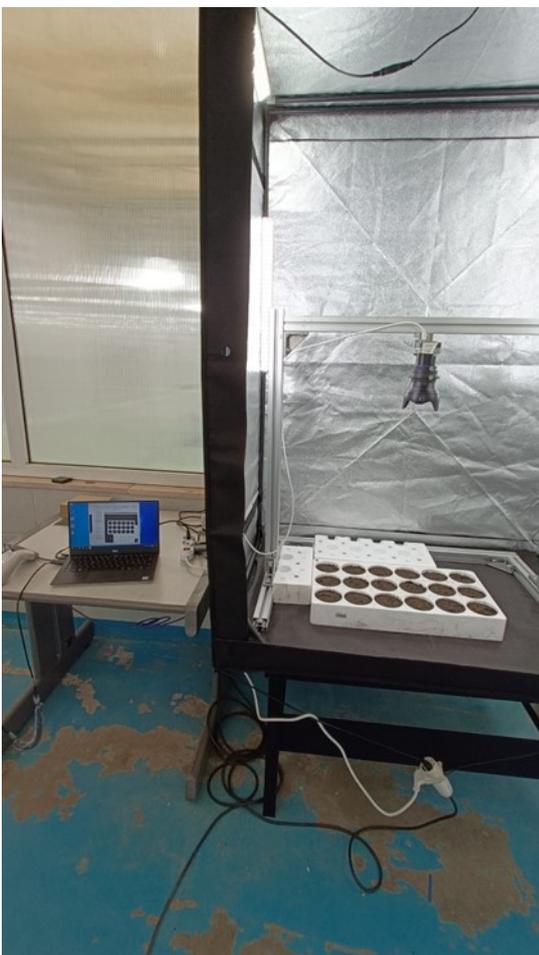


Figura 1. Sistema (box) per l'acquisizione di immagini RGB Top view dei plateau

Il sistema comprende, oltre all'hardware su riportato, un software sviluppato per questo scopo che si interfaccia con un lettore di codici a barre e che permette di standardizzare e velocizzare le operazioni di acquisizione e salvataggio dei dati, sia in formato raw sia in formato compresso.

5) Estrazione dei traits ed analisi dei dati

L'analisi del fenotipo in Top View sarà effettuata mediante l'utilizzo delle immagini digitali acquisite nello spettro visibile (RGB). L'analisi delle immagini seguirà una serie di passaggi fondamentali. Inizialmente, saranno applicate tecniche informatiche (computer vision) di segmentazione per isolare le piante dallo sfondo, realizzando 18 aree di interesse (ROI: Region Of Interest) per seminiera, garantendo immagini chiare e prive di interferenze dovute allo sfondo. Questo processo permetterà di distinguere con precisione ogni pianta separandola da quella adiacente e permettendo di misurare accuratamente tutti i parametri chiave. Successivamente, le immagini segmentate saranno analizzate per misurare 13 parametri, e precisamente:

Raw Area, Raw Width, Raw Height, Raw Convex Hull Area, Raw Long Path, Green Area, Greener Area, Solidity, Ellipse Eccentricity, Raw Ellipse Major Axis, Raw Ellipse Minor Axis, Senescence Index, Hue Circular Mean.

In parallelo, in collaborazione con il gruppo STIIMA di Bari, sarà avviata una strategia di analisi basata sull'elaborazione delle immagini e su algoritmi di apprendimento automatico. La pipeline consentirà di valutare automaticamente i tratti fenotipici rilevanti di una popolazione di mutanti genotipici, confrontandoli con il loro Red Setter per quanto riguarda la risposta allo stress da siccità.

6) Individuazione dei putativi mutanti di interesse

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi di immagine si procederà con la selezione dei mutanti che presentano il fenotipo di interesse.

7) 7) Allevamento dei putativi mutanti e produzione seme

Le singole piante M3 selezionate saranno allevate in condizioni controllate presso vivaisti di fiducia di ALSIA ed utilizzate per la produzione del seme M4. La raccolta del seme avverrà per singola pianta di ciascuna famiglia mutante.

TEMPI: 10 mesi dalla data di avvio

COSTI LOTTO 1: 9.000 €+ IVA (22%). 10.980 € IVA inclusa

PREZZO SCONTATO RISERVATO: 10.000 € (IVA inclusa)

La consegna dell'Output è prevista entro 3 mesi dalla data di fine esperimento e consisterà in:

- report sintetico con descrizione dell'attività e dei traits
- grafici con gli andamenti dei principali traits delle famiglie mutanti
- raw data

LOTTO 2

STUDIO DEL FENOTIPO DI PUTATIVI MUTANTI NELLA RISPOSTA A VOC, IDENTIFICATI CON IL LOTTO1, MEDIANTE IMAGING CON PIATTAFORMA AD ELEVATA EFFICIENZA (HIGH THROUGHPUT PHNOTYPING, HTP).

La piattaforma PHENOLab DI ALSIA

Presso il Centro Ricerche Metapontum Agrobios (CRMA) dell'ALSIA, localizzato a Metaponto (MT), è disponibile la prima piattaforma tecnologica automatizzata "*plant to sensor*" presente in Italia, in grado di studiare lo sviluppo della pianta e le sue variazioni in relazione alle caratteristiche ambientali ed al genotipo e l'apparato radicale attraverso l'analisi di immagine. L'infrastruttura di ricerca è stata realizzata nel 2009 grazie ad un finanziamento della Regione Basilicata, e rientra nelle linee di ricerca, sviluppo e fornitura di servizi qualificati del campo della "fenomica" vegetale.

Una completa infrastruttura di acquisizione immagini (Scanalyzer 3-D System della LemnaTec GmbH) è installata presso una serra di ricerca del CRMA. Essa consente l'acquisizione in riflettanza e l'analisi dell'immagine nello spettro del visibile e dell'infrarosso e di conservare le immagini ed i dati acquisiti in un sistema informatico. Mediante questa tecnologia è possibile rilevare in modo automatico parametri morfometrici e fisiologici di crescita della pianta durante le fasi di sviluppo, a tempi stabiliti dall'operatore. Tutte le misurazioni avvengono in modo non distruttivo, senza disturbare la crescita della pianta, e possono quindi essere ripetute diverse volte durante il ciclo colturale. La piattaforma dispone anche di un sistema per lo studio mediante immagini dello sviluppo e dell'attività dell'apparato radicale, che impiega uno specifico set-up sperimentali con tubi di plastica trasparente di circa 60 cm di altezza che consente l'acquisizione di immagini delle radici in RGB.

I settori di utilizzo dell'infrastruttura di acquisizione immagini sono molteplici. Nel campo della ricerca viene utilizzata per lo studio del fenotipo di piante, in risposta al genotipo ed a particolari condizioni ambientali e nutrizionali (es. stress idrico e salino).

OGGETTO

Realizzazione di una prova sperimentale di valutazione della risposta di genotipi mutanti sottoposti a priming VOC e stress idrico.

ATTIVITÀ

1) SEMINA E TRATTAMENTO DI PIANTE MUTANTI M4

I semi M4 prodotti da piante M3 saranno seminati in vasi singoli e le piante M4 germinate saranno fenotipizzate per la loro risposta ai VOC in condizioni di stress idrico in un disegno sperimentale comprendente le seguenti 4 tesi:

1. PRIMING e STRESS IDRICO
2. PRIMING e assenza di STRESS IDRICO
3. NO PRIMING e induzione di STRESS IDRICO
4. NO PRIMING e NO STRESS IDRICO

Per ogni tesi sperimentale verranno analizzate almeno 6 piante (repliche biologiche) per un totale di 96 piante.

2) ANALISI DI IMMAGINE CON LA PIATTAFORMA SCANALYZER 3-D SYSTEM (LEMNATEC GMBH)

Le piante mutanti M4 verranno caratterizzate per la loro risposta ai VOC e allo stress abiotico mediante l'utilizzo della piattaforma SCANALYZER 3-D SYSTEM (LEMNATEC GMBH). Attraverso l'analisi di immagine saranno inoltre raccolti dati su crescita, sviluppo, architettura e indici colorimetrici delle piante.

PIATTAFORMA: AGROBIOS PHENOLAB - ALSIA - Centro Ricerche Metapontum Agrobios

SPECIE: Pomodoro

DURATA: 60 giorni circa dalla data di avvio degli esperimenti

MUTANTI: N. 4. L'ipotesi di lavoro prevede l'isolamento nel lotto 1 di 4 putativi mutanti di interesse

ALLEVAMENTO: 6 piante per famiglia M4.

IPOTESI TESI:

- genotipi/mutanti = 4
- trattamenti/tesi: 4; le condizioni di stress idrico saranno concordate prima dell'avvio della prova sperimentale.
- Repliche: 6 (numero minimo consigliato)

TOTALE vasi: 96

TERRENO: 3,5 kg substrato sabbioso di coltivazione con un basso tenore in elementi nutrizionali. Eventuali variazioni della tipologia del suolo possono essere concordati con il committente.

CONDIZIONI ALLEVAMENTO: piante allevate nei vasi in serra con irrigazione e cure colturali standard in funzione della necessità (tutte le operazioni colturali saranno registrate)

IMAGING: Sensori RGB, 1 acquisizione/settimana per tutto il periodo della prova per un totale di circa 10 time point.

TRAITS:

- Projected Shoot Area (PSA)
- Indici di colore (dark green, yellow index, ecc.)
- Indice di senescenza

CONDIZIONI AMBIENTALI: Coltura in condizioni semi controllata (serra). I parametri ambientali sono monitorati da un network di 9 sensori (PAR, Umidità relativa, T)

COSTO ATTIVITA': 122,00 euro a vaso IVA inclusa = Totale 11.712,00 euro (IVA inclusa)

PREZZO SCONTATO RISERVATO: € 10.000,00 (IVA inclusa)

PAGAMENTO: 30GG dalla data di Consegna risultati.

La consegna dell'Output è prevista entro 3 mesi dalla data di fine esperimento e consisterà in:

- report sintetico con descrizione dell'attività e dei traits
- grafici con gli andamenti dei principali traits
- raw data

Bibliografia

Minoia S et al. (2010) BMC Res Notes, 3:69.