



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
"ORTOFLOROFRUTTICOLTURA" XXI CICLO**

**Trasformazione genetica e flusso genico in fragola:
ereditarietà ed espressione dei transgeni.**

settore scientifico-disciplinare
(AGR/03)

Coordinatore: Prof. Alberto Graifenberg

Firma *A. Graifenberg*

Tutor: Dir. Carmine Damiano

Firma *Carmine Damiano*

Dottoranda: Alessia Gargaro

Firma *Alessia Gargaro*

Ringraziamenti

Vorrei rivolgere i mie più sentiti ringraziamenti, in primo luogo, al Dott. Carmine Damiano, direttore del Cra-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, che mi ha accordato la sua fiducia e che mi ha dato la possibilità di svolgere la tesi di dottorato presso il Centro di cui sopra.

Un ringraziamento speciale vorrei rivolgerlo anche alle dottoresse della ex-Sezione di Micropropagazione, la Dott.ssa Maria Antonietta Palombi e la Dott.ssa Simona Monticelli, per aver supportato l'espletamento delle mie attività in laboratorio.

Alla Dott.ssa Emilia Caboni, alla Dott.ssa Adele Gentile e ad Andrea Frattarelli per i preziosi consigli dispensatimi.

Ad Angelo per avermi aiutato nella gestione della serra, nonché a tutti gli altri con cui ho stretto una sincera amicizia tra cui, Marcella Agostinelli, Elisa Catenaro, Maurizio Moser.

Ai miei compagni di laboratorio con cui ho condiviso, negli ultimi tre anni, le mie giornate lavorative e non e con cui si è instaurato un rapporto di reciproca stima e collaborazione: Elisa Costantini, Emiliano Condello, Maria Arias Padro, Melania Perazzini, Jessica Giovinazzi, Sabrina Micali e Elisa Vendramin.

Al Dott. Francesco Saccardo, professore dell'Università di Viterbo, per la sua estrema gentilezza e disponibilità.

Ai miei colleghi di Dottorato, con una menzione speciale per Chiara Lo Bianco, che mi hanno accolta con estrema cordialità e simpatia.

Ed infine, ringrazio i miei cari che mi hanno sempre sostenuto e sopportato, anche nelle trasferte a Viterbo, ed il mio fidanzato Emiliano sempre presente e premuroso.

Alessia G.

I INTRODUZIONE	6
1.1 La fragola	6
1.2 La propagazione in fragola	11
1.2.1 Aspetti Generali	11
1.2.2 La propagazione della fragola attraverso la morfogenesi diretta	17
1.2.3 La propagazione della fragola attraverso la morfogenesi indiretta	18
1.2.4 Il miglioramento genetico della fragola attraverso le colture in vitro	21
1.3 La trasformazione	23
1.3.1 Aspetti generali	23
1.3.2 Trasformazione in fragola	26
1.3.3 Genetica molecolare in fragola	31
1.4 Il flusso genico	40
1.4.1 Aspetti generali	40
1.4.2 Colture GM: regolamentazione	46
1.4.3 Valutazione del rischio delle colture GM	49
II SCOPO DELLA TESI	55
III MATERIALI E METODI	58
3.1 Prove di incrocio	58
3.1.1 Piante donatrici di polline	58
3.1.2 Piante portaseme	60
3.1.2 Soluzioni e terreni di coltura	60
3.1.3 Prove di vitalità e germinazione su polline	61
3.1.4 Impollinazione e raccolta dei semi	61
3.1.5 Prove di germinazione su semi e micropropagazione delle piante	63
3.1.6 Saggi GUS	63
3.1.7 Selezione su kanamicina	64
3.2 Analisi molecolari delle piante di fragola	65
3.2.1 Materiale vegetale	65
3.2.2 Estrazione del DNA	66
3.2.3 Analisi PCR	68
3.2.4 Southern blotting	69
3.3 Trasformazione	74
3.3.1 Materiale vegetale	74
3.3.2 Ceppi batterici	74
3.3.3 Terreno di coltura per batteri	75
3.3.4 Infezione mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	75
3.3.5 Rigenerazione e selezione dei rigeneranti transgenici	75
IV RISULTATI	77
4.1 Incroci	77
4.1.1 Vitalità e germinabilità del polline	77
4.1.2 Germinazione dei semi	79
4.1.3 Espressione GUS in semi e in foglie	80
4.1.4 Selezione con kanamicina della progenie derivante da incrocio	82
4.2 Analisi molecolare	83
4.2.1 Analisi molecolare in PCR	83
4.2.2 Southern blotting	84
4.3 Trasformazione	86

V DISCUSSIONE	91
VI BIBLIOGRAFIA.....	98

I

INTRODUZIONE

1.1 La fragola

Originaria dell'Europa e dell'Asia settentrionale, dove cresceva allo stato selvatico, la fragola (*Fragaria vesca* L.) veniva chiamata "Fragans" dai Romani (**Fig.1**). Essa è una pianta erbacea perenne appartenente alla famiglia delle Rosacee, genere *Fragaria*; le piantine sono alte una quindicina di centimetri e si propagano sia per via gamica che vegetativamente, per mezzo di stoloni. Le foglie sono lucide sulla pagina superiore, più chiare e pelose al livello della pagina inferiore; sono trifogliate a foglioline ovali inciso-dentate. I fiori sono bianchi a cinque petali, che iniziano a dischiudersi in maggio e si rinnovano varie volte nel corso dell'anno a seconda della specie. Le fragole sono falsi frutti composti da un ricettacolo carnoso ovoidale, di colore rosso, polpa succosa e molto profumata, su cui sono posizionati i veri frutti, gli acheni. Il suo areale di distribuzione va dalla Sicilia all'estremo nord dell'Europa. Di questa specie esistono numerosi biotipi con caratteristiche molto diverse fra loro: unifere o rifiorenti (*Semperflores*), stolonifere o no (var. *Alpina*). Essa è una pianta di sottobosco, che si adatta soprattutto ai terreni acidi.

1.1.1 Le cultivar e la distribuzione della fragola

Fino al XVII secolo, in Europa venivano coltivate specie di fragola selvatiche autoctone (*F. vesca* L., *F. viridis* L., *F. moschata* Duch.) e altre introdotte dall'America del Nord (*F. virginiana* Duch.).

Il contributo più importante alla coltivazione di questa specie lo fornì un ufficiale francese, A. F. Frasier, che importò dal Cile cinque piante pistillifere di *F. chiloensis* L. (Duch.) che aveva scelto per i frutti di grossa pezzatura. Una di queste piante venne per caso allevata insieme ad altre piante staminifere di *F. virginiana* Duch., anch'essa di origine nord americana. Gli acheni vennero raccolti e seminati dando origine all'odierna *Fragaria x ananassa* Duch.

Per una suddivisione schematica la fragola viene classificata secondo diversi criteri. Tra di essi vi è quello basato sull'assetto cromosomico: la fragola ha come numero base sette cromosomi. Il primo gruppo comprende le specie diploidi ($2n=2x=14$), tra cui

troviamo la *F. vesca*. In Europa troviamo un'altra specie, meno diffusa, diploide, che somiglia molto alla *F. vesca*, ma che si adatta ai terreni calcarei: la *F. viridis*.



Fig. 1. *Fragaria vesca* L.

Al secondo gruppo appartengono le specie tetraploidi ($2n=4x=28$), tra cui la *F. orientalis* Los.; nella terza classe troviamo, invece, le specie esaploidi, e fra queste la *F. moschata* Duch. ($2n=6x=42$), diffusa particolarmente in Germania e in Francia, ma anche in Italia dove il limite meridionale dell'areale di espansione è la Valle Padana. Essa ha fiori dioci, ma è caratterizzata dall'avere anche cloni con fiori perfetti, chiamati in Francia "Capron", e soprattutto nei cloni diffusi in coltura (in Italia, in provincia di Alessandria è presente ancora la "Profumata di Tortona"), presenta frutti piuttosto grossi, 2-3 g, dal colore che va dal rosa chiaro al rosso, di solito di forma arrotondata, caratterizzati da un penetrante aroma moscato e dal calice molto riflesso che si distacca abbastanza agevolmente a completa maturazione. Questa specie rappresentava, fino al Settecento, la sola in grado di fornire, sulle mense dei consumatori europei, fragole di grosse dimensioni, ben diverse, naturalmente, da quelle della *Fragaria x ananassa*, che è oggi diffusa anche in quelle aree, come il continente africano e australiano, in cui la fragola non è presente come pianta spontanea. Quest'ultima è invece ottoploide ($2n=8x=56$), come le due specie da cui è derivata, *F. chiloensis* e *F. virginiana*.

Solo di recente anche un'altra ottoploide, diffusa anch'essa nel continente americano, *F. ovalis* Rydb., è stata utilizzata per introdurre in *Fragaria x ananassa* il carattere d'indifferenza nei confronti del fotoperiodo ("day neutral"). La quarta specie ottoploide, *F. iturupensis*, è la sola monoica e la sola rinvenuta al di fuori del continente americano, cioè nell'isola Iturup nelle Kurili: è stata segnalata per la prima volta nel 1973, ma non è stata ancora utilizzata nel miglioramento genetico.

Anche se le due specie da cui deriva la *Fragaria x ananassa* sono diffuse nelle più diverse condizioni climatiche, l'opera dei genetisti ha senz'altro portato a un'adattabilità più ampia di quella delle specie di partenza sfruttando la variabilità in esse esistente.

Grazie alle varie tecniche colturali e all'ibridazione sono state ottenute diverse cultivar. Il termine cultivar, secondo il Codice Internazionale di Nomenclatura Botanica (art. 28), indica una varietà o specie di organismo vegetale, geneticamente selezionata, con caratteristiche ottimali per la coltivazione, di cui non sono conosciute forme selvatiche.

Secondo il progetto finalizzato 'Liste di orientamento varietale' del Ministero per le Politiche Agricole, sono state prodotte quattro liste comprendenti le cultivar di fragola raccomandate per la coltivazione. La prima fu presentata nel 1994, le altre, pubblicate negli anni successivi, ne rappresentavano degli aggiornamenti. Tali frequenti aggiornamenti si rendono necessari perché ogni anno in Italia e negli altri Paesi frutticoli vengono costituite e introdotte nuove cultivar.

Le cultivar vengono suddivise nelle quattro liste (A, B, C e D) in base alle loro caratteristiche valutate in campi sperimentali per almeno due anni; oltre agli aspetti agronomici e produttivi vengono valutati anche quelli qualitativi, nutrizionali e commerciali (Nicotra, 1997).

La lista del 1997 comprende 18 varietà di fragola di cui 10 sono state inserite nella lista A per le loro caratteristiche pregevoli adatte a grandi aree geografiche e sulle quali si può puntare per valide produzioni commerciali (Faedi e Baruzzi, 1997). Le scelte varietali sono fatte in base all'ambiente e alle tecniche colturali, poiché queste specie frutticole ne dipendono pienamente.

1.1.2 Importanza Economica

Nonostante la fragola non sia un componente essenziale della dieta, il suo gusto e il suo aroma dolce e profumato, il suo aspetto così attraente e la sua reperibilità stagionale fanno di questo frutto una coltura eccellente. Inoltre, la fragola è ricca in composti fitochimici e potenziali anti-ossidanti, principalmente acido ellagico e flavonoidi, che possono diminuire i rischi di patologie cardiovascolari e l'insorgenza di tumori (Hannum 2004). Tutte queste qualità ne hanno aumentato l'importanza economica nel mondo e, oggi, è considerata tra le coltivazioni di maggior interesse sia dal punto di vista della ricerca che nella produzione dei frutti. Le principali problematiche di natura agronomica riguardano i trattamenti convenzionali che sono ritenuti poco eco-sostenibili come: la fumigazione del suolo antecedente la messa a dimora delle piantine, un largo utilizzo di plastica per tenere sotto controllo la crescita indesiderata di erbacce, un'alta richiesta di acqua e una frequente applicazione di pesticidi (Pritts 2002). Inoltre, la mancanza di fonti di resistenza alle principali malattie e agli stress ambientali, la qualità del frutto e il post-raccolta sono tra le maggiori sfide nella produzione della fragola. Molti programmi di miglioramento genetico sono indirizzati a dare una risposta a questi problemi (Faedi *et al.* 2002), ma il sistema convenzionale di incrocio e selezione è ostacolato dalla natura ottoploide e dall'alta eterozigosità di queste specie. Inoltre, le varietà coltivate presentano una base genetica non molto ampia, dovuta all'utilizzo di due o poche cultivar come progenitori, e la maggior parte dei geni nelle cultivar moderne deriva per lo più da fonti nucleari e citoplasmatiche (Sjulin and Dale 1987; Dale and Sjulin 1990). Per queste ragioni, le specie selvatiche sono state inserite nei programmi di miglioramento

genetico per aumentare la variabilità genetica della specie (Faedi *et al.* 2002; Hancock *et al.* 2002; Marta *et al.* 2004).

La produzione mondiale della fragola ha mostrato un significativo incremento negli ultimi 25 anni. Dal 1980 al 2004 gli appezzamenti coltivati con fragola sono aumentati del 25%, mentre la produzione dei frutti è incrementata del 73%. Nel 2004, vi erano 214,118 ha coltivati, raggiungendo una produzione di 3,1 milioni di tonnellate (FAOSTAT 2005, http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp). Cinquantasette stati hanno partecipato a questa produzione, anche se solo nove di questi hanno contribuito a più del 72% del totale. Durante il periodo che va dal 2000 al 2004, la produzione media mondiale era di 3,17 milioni di tonnellate, le nazioni con la maggiore produzione erano gli USA (830,000 t annue, 26.2% della produzione mondiale e 8.7% dell'area mondiale), Spagna (307,000 t annue, 9.7% e 4.2%), Korea (210,000 t annue, 6.6% e 3.9%), Giappone (206,000 t annue, 6.5% e 3.3%), Italia (167,000 t annue, 5.3% e 2.9%), Polonia (160,000 t annue, 5.2% e 22.6%), Messico (143,000 t annue, 4.5% e 2.6%), Turchia (136,000 t annue, 4.3% e 5%) e la Federazione Russa (135,000 t annue, 4.2% e 5.3%). Un confronto tra questi dati e quelli riportati da Faedi *et al.* (2002) per il periodo 1995-1999 mostra un lieve incremento nella produzione di molti paesi, specialmente in Corea e in Turchia, con una lieve flessione in Italia e in Polonia.

Approssimativamente il 15% della produzione mondiale di fragola è esportato come frutto fresco. Primo paese esportatore è la Spagna con 212,300 t, l'81% della sua produzione seguita dagli USA con 94,600 t, l'11% del prodotto interno. La California ha più dell'85% della produzione della fragola (Sjulin 2003). Questa regione, inoltre, ha all'attivo numerosi programmi d'incrocio di successo. Infatti, il programma dell'Università della California ha realizzato diverse varietà popolari tra cui Camarosa, Chandler, Seascape, Selva, Pajaro e Oso Grande, che contribuiscono a più del 50% della produzione mondiale di fragola (Faedi *et al.* 2002).

1.2 La propagazione in fragola

1.2.1 Aspetti Generali

La fragola viene spesso attaccata da numerosi patogeni che causano una diminuzione dal 20 all'80% del raccolto, a secondo della cultivar impiegata. Con la propagazione vegetativa tradizionale è impossibile controllare i parametri coinvolti nella diffusione di questi patogeni e spesso l'infezione rimane latente manifestandosi solo dopo la fioritura della pianta, così da provocare notevoli problemi alla produzione e alla commercializzazione dei frutti. In questi casi solo un controllo di tipo preventivo può risultare efficace. Quindi, l'applicazione delle colture *in vitro* alla fragola sta avendo un utilizzo sempre più elevato per la produzione di piante sane.

Nei programmi di riproduzione della fragola sono stati ampiamente usati la moltiplicazione clonale (Boxus, 1974), la coltura dei tessuti applicata alla conservazione del germoplasma (Mullin and Schlegel, 1976; Damiano, 1979; Kartha *et al.*, 1980) e la coltura di antere, per la produzione di individui allotoploidi e poliploidi (Rosati *et al.*, 1975; Laneri e Damiano, 1980).

Nonostante le difficoltà riscontrate, tra cui l'alto costo iniziale, la propagazione *in vitro* della fragola ha rappresentato, fin dagli anni '80, la tecnica più efficace ed economicamente più vantaggiosa; ciò è dimostrato anche dai numerosi laboratori istituiti in quegli anni in Europa e Stati Uniti (Damiano, 1980).

Le prime applicazioni delle colture *in vitro* alla fragola non erano rivolte alla propagazione clonale, ma al risanamento delle cultivar attraverso la coltura dei meristemi. I numerosi lavori condotti in questa direzione (Belkengren and Miller, 1962; Miller and Belkengren, 1963; Vine, 1968; Mullin *et al.*, 1974) hanno prodotto notevoli risultati, dimostrando che la fragola *in vitro* si adatta a differenti tipi di miscele di Sali minerali. McGrew nel 1965 dimostrò che l'eliminazione dei virus dipendeva fortemente dalla durata del trattamento termico e dalle dimensioni dell'apice prelevato. L'utilizzo di apici di 2-6 mm di lunghezza prelevati da piante mantenute per 25 giorni alla temperatura di 35 °C, produce piante prive di virus. Oggi l'individuazione di specifici mezzi di coltura permette l'utilizzo di apici di dimensioni inferiori al millimetro, che avranno così ancora minime possibilità di essere contaminati da funghi o da altri parassiti esterni (Boxus *et al.*, 1977).

Fattori fisico-chimici importanti per l'ottenimento di colture *in vitro* di fragola sono: la luce (durata, intensità e qualità), la temperatura e la composizione del terreno (tipo di ormone, pH, concentrazione di zuccheri e di agar).

Mullin *et al.* (1974) propongono l'utilizzo di una lampada a fluorescenza bianca a 2000 lux; Boxus (1974), invece, considera sufficiente un'intensità di 1000-1500 lux. Belkegren e Miller (1962) mantengono la coltura sempre alla luce, mentre Mullin *et al.* (1974) riportano un fotoperiodo di 18 ore, ridotto a 16 ore da molti autori. La temperatura più idonea si aggira attorno ai 20-25 °C.

La coltura *in vitro* della fragola era utilizzata in origine esclusivamente per ottenere un limitato numero di piante madri prive di malattie, attualmente rappresenta il più veloce e efficiente metodo di propagazione della fragola. Nel 1974 Boxus diede un contributo fondamentale alle tecniche di coltura *in vitro* indicando la possibilità di moltiplicare la fragola su scala industriale, adottando la miscela di Sali proposta da Knop (1865). Questo metodo si basa sulle proprietà di due ormoni: la 6-benzilaminopurina (BAP) e l'acido 3-indolbutirrico (IBA). Con la presenza della BAP le gemme dormienti dell'apice vegetativo sono stimolate a crescere e ad allungarsi, sviluppando nuovi assi, mentre senza di BAP e in presenza di IBA, l'auto-riproduzione delle gemme si arresta e ognuna di esse formerà radici e svilupperà una nuova pianta completa (Boxus *et al.*, 1984).

Il metodo per la propagazione *in vitro* della fragola, attraverso la coltura di meristemi proposto da Boxus (Boxus, 1976; Boxus *et al.*, 1977) e successivamente ripreso da Damiano (Damiano, 1980), si basa sulle seguenti fasi (**Fig. 2**):

- a) coltura asettica di meristemi apicali di differenti misure;
- b) controllo dei virus
- c) propagazione *in vitro* massale dei germogli;
- d) formazione di radici;
- e) trasferimento delle piante in campo.

a) Coltura asettica di meristemi apicali di differenti misure

I meristemi di fragola, dopo opportuna sterilizzazione, vengono posti su terreno contenente: i macroelementi di Knop (Knop, 1865), i microelementi di MS (Murashige and Skoog, 1962), 1 mg/l di IBA, 0.1 mg/l di BAP e 0.1 mg/l di GA₃. Dopo 45 giorni di coltura, per i piccoli apici meristemati, e dopo 30 giorni per quelli più grandi, si ottengono delle piantine complete, con poche radici e con le tipiche foglie unifogliate della fase giovanile.

b) Controllo dei virus

In questa fase si eseguono le stesse procedure elencate nel paragrafo della propagazione *in vitro*.

c) Propagazione in vitro massale dei germogli

Ultimato il processo di controllo dei virus, le piante di fragola sane vengono trasferite nel mezzo di moltiplicazione. Per la formazione dei nuovi germogli è necessario rinnovare frequentemente il terreno di coltura. Tuttavia, anche se questo tipo di mezzo permette generalmente un'adeguata proliferazione dei germogli di tutte le cultivar, l'efficienza di propagazione, misurata come numero di piante prodotte per giorni di subculture, varia da cultivar a cultivar. In primo luogo dipende dall'ammontare di BAP usata. Anche l'interazione tra l'auxina e la citochinina è essenziale per lo sviluppo dell'espianto: concentrazioni di 0.25-2.5 mM di citochinina e 0.25-1.0 mM di auxina rappresentano livelli ottimali.

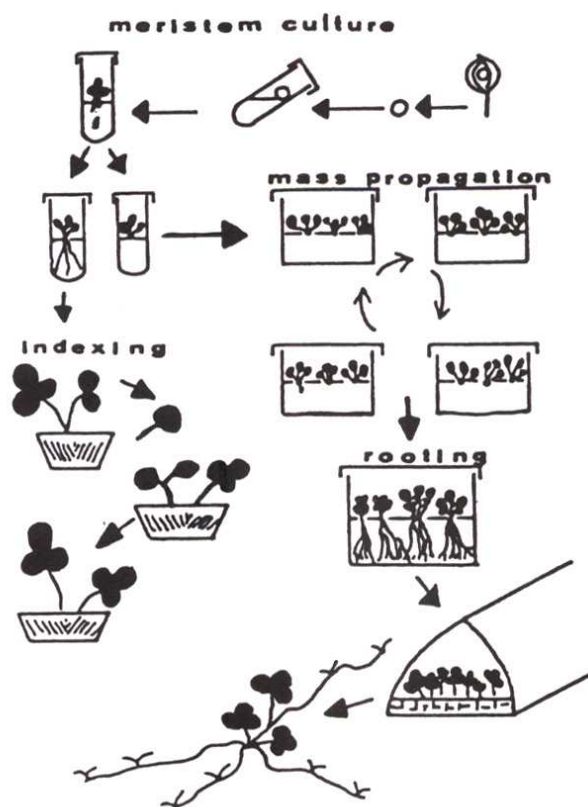


Fig. 2. Fasi della propagazione (Damiano, 1980)

d) Formazione di radici

Il mezzo più adatto per la radicazione delle piantine di fragola prevede l'aggiunta di solo IBA, mentre restano invariate tutte le altre condizioni di crescita. Appena gli espianti vengono messi su mezzo di radicazione, le foglie diventano più verdi e le piantine cominciano ad allungarsi. Dopo il decimo o il dodicesimo giorno di incubazione le piante iniziano a formare radici, che raggiungono la lunghezza di circa 3-4 cm al venticinquesimo o al trentesimo giorno. Il mezzo di radicazione può essere modificato per permettere una crescita più rapida e un maggior allungamento delle radici, 3-5 cm in soli 10-15 giorni. Ad esempio, si può aggiungere 0.5-2 gr/l di carbone attivo al mezzo (Damiano, 1978; Boxus *et al.*, 1984).

e) Trasferimento delle piante in campo

Il terreno nel quale le piante di fragola dimostrano una migliore ripresa vegetativa è costituito o da sola torba o da una miscela al 50% di torba e sabbia con un pH del mezzo intorno a 5,5-7,0. Un altro fattore critico è rappresentato dall'umidità relativa, che non deve essere mai inferiore al 90%. Per assicurare un rapido sviluppo è necessario fornire un fotoperiodo abbastanza lungo. In circa 45 giorni, le piante formano 3-5 foglie trifogliate, tipiche della fase adulta, e un soddisfacente apparato radicale. Da questo momento in poi, possono essere trasferite in pieno campo (Damiano, 1977). La fase di trasferimento al terreno delle piantine di fragola ha una percentuale di successo molto elevata (95-100%) (Boxus, 1974; Damiano, 1977). A partire da questo protocollo generale, molti autori, per la coltura dei meristemi di fragola, hanno sperimentato diversi tipi di terreni con concentrazioni diverse di agar, di carboidrati e di pH. In particolar modo, quello che più influenza l'efficienza delle colture di meristemi è l'aggiunta al mezzo di determinati tipi di ormoni e le loro diverse concentrazioni. Nella **Tabella 1** sono riportate le principali concentrazioni degli ormoni, dei macro e dei microelementi proposti dai vari autori.

Tab. 1. Terreni e regolatori di crescita utilizzati per la coltura di meristemi di fragola.

NUTRIENTI <i>Macro</i> <i>Micro</i>		REGOLATORI DI CRESCITA	MATERIALE	BIBLIOGRAFIA
White ^a	White	IBA 2,46 µM	Coltura di meristemi	BelKengren e Miller '62
White	White	nessuno	Coltura di meristemi	BelKengren e Miller '62
Knop ^b	MS ^c	BA 0,44 µM + IBA 4,92 µM + GA 0,29 µM	Coltura di meristemi	Boxus '74
Knop	MS	BA 4,4 µM + IBA 4,92 µM + GA 0,29 µM	Fase di moltiplicazione	Boxus '74
Knop	MS	BA 4,4 µM	Fase di radicazione	Boxus '74
Knop ^d	^e	nessuno	Coltura di meristemi	Mc Grew '80
Knop	Bertholet ^f	IAA 5,71 µM o IAA 14,27µM + Kin 0,46	Coltura di meristemi	Mullin <i>et al.</i> '74
Knop	MS	nessuno	Fase di multipl. <i>Gorella, Elvira</i> <i>e Redgauntle</i>	Cossio e Menim '82
Knop	MS	IBA 1 mg/l	Fase di radicazione	Cossio e Menim '82

^a Mezzo di White, 1963.^b Mezzo di Knop, 1875.^c Mezzo di Murashige e Skoog, 1962.^d Mezzo di Knop, 1875, modificato (in mM) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 2,12$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 0,5$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,92$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = 0,95$; $\text{KCl} = 1,67$.^e Micronutrienti di McGrew, 1965.^f Mezzo di Mullin *et al.*, 1974.

Una volta ottenute le piantine di fragola, diverse sono le tecniche per la loro conservazione che permettono di distribuire uniformemente la produzione nel corso dell'anno. Gli espianti *in vitro* possono essere conservati per lunghi periodi a basse temperature, 1-2° C al buio (Mullin and Schlegel, 1976; Boxus *et al.*, 1977; Damiano *et al.*, 1979). Le piante radicate possono essere conservate anche per diversi mesi (Boxus *et al.*, 1977), ma il successo della conservazione dipende dal tipo e dal vigore della cultivar. Per alcune cultivar la conservazione si può prolungare anche fino a 27 mesi; 2 o 3 trasferimenti sono, però, necessari prima di riottenere una rapida moltiplicazione (Damiano, 1979).

Mullin e Schlegel (1976) hanno conservato piantine di 50 diverse cultivar di fragola per 6 anni, mantenendole al buio e a 4° C.

Un efficace metodo per la conservazione della risorsa genetica delle piante è la crioconservazione. Kartha *et al.* (1980) hanno ottenuto dei buoni risultati con la crioconservazione dei meristemi di fragola. Yongjie *et al.* (1977) hanno messo a punto un efficace protocollo relativo alla crioconservazione delle sospensioni cellulari di fragola, valutando l'influenza dei vari parametri coinvolti in tale processo.

I lavori di Swartz *et al.* (1981) e di Cameron e Hancock (1986) hanno confermato che le piante di fragola, provenienti da colture di tessuti, presentavano un maggior numero di fasci fiorali, frutti di minor dimensioni, un maggior raccolto, la produzione di un più elevato numero di stoloni e un aumentato vigore rispetto alle piante propagate con i metodi convenzionali. Damiano *et al.* (1980) indicano che, anche se la progenie delle piante micropropagate non è immune dai parassiti del terreno, essa non risulta certamente più sensibile alle infezioni rispetto alle piante propagate tradizionalmente.

Tra le varie tecniche applicate alle colture *in vitro* è da includere la coltura di protoplasti. I protoplasti sono cellule vegetali complete private della parete cellulare, pertanto sono molto più facili da manipolare a livello genetico rispetto alle cellule vegetali integre. Con i protoplasti è possibile applicare tecniche di trasformazione con DNA nudo, produrre ibridi somatici attraverso la fusione dei protoplasti stessi e introdurre organelli o nuclei eterologhi. La fusione dei protoplasti potrebbe rappresentare la soluzione al problema della introgressione di specie selvatiche di *Fragaria* o di altri generi nella fragola coltivata per estendere la sua base genetica (Sjulin and Dale, 1987). Pertanto la fusione dei protoplasti rappresenta un mezzo per ottenere la formazione di cellule ibride somatiche in quelle specie "recalcitranti", dove non sempre è possibile l'ibridazione sessuale.

Per la fragola, in realtà, non è stata mai ottenuta un'adeguata fusione di protoplasti. Tra i vari tentativi effettuati si può menzionare il lavoro di Nyman e Wallin (1988), i quali pubblicarono un protocollo relativo all'isolamento dei protoplasti e alla rigenerazione di fragola.

1.2.2 La propagazione della fragola attraverso la morfogenesi diretta

La fragola è in grado di produrre germogli con alta efficienza direttamente dai tessuti dell'espanto, senza passare attraverso la formazione del callo. I germogli neoformati possono essere a loro volta frammentati per altre subculture o moltiplicati per germogli ascellari. Rigenerazione diretta di piante di fragola è stata ottenuta attraverso l'organogenesi da tessuti fogliari (Liu and Sanford, 1988; Nehra *et al.*, 1992; Gemmali *et al.*, 1994). In **Tabella 2** sono riportati i principali terreni e le principali concentrazioni ormonali utilizzate nella propagazione per morfogenesi diretta.

Tab. 2 . Terreni ed ormoni utilizzati per la rigenerazione diretta di fragola.

NUTRIENTI		REGOLATORI DI CRESCITA	ESPIANTO	BIBLIOGRAFIA
LS ^a + KNO ₃ + caseina		BA 2,5 mg/l + IBA 0,5 mg/l	Foglie e stoloni	Liu e Sanford, '88
MS ^b + vitamine B5		BA 10 µM + IAA 10 µM	Foglie	Nehra <i>et al.</i> , '89
MS		BA 5 µM + NAA 5 µM	Cotiledoni	Miller e Chandler, '90
Macro Knop ^c	Micro MS	BA 1 mg/l + IBA 1 mg/l + GA 0,1 mg/l	Stipole	Jemmali <i>et al.</i> , '92

^a Mezzo di Linsmaier e Skoog, 1965.

^b Mezzo di Murashige e Skoog, 1962.

^c Mezzo di Knop, 1965.

Nelle tecniche per morfogenesi diretta è compresa anche la propagazione per embriogenesi diretta, che prevede la formazione di embrioni somatici direttamente da tessuto. Inducendo embrioni zigotici immaturi di fragola, in presenza di BA e di NAA, Wang *et al.* (1984) hanno ottenuto la rigenerazione diretta. Le tecniche di embriogenesi somatica rappresentano una potenziale alternativa ai metodi di micropropagazione e di propagazione convenzionale; è auspicabile che queste tecniche possano essere applicate in futuro anche alla fragola. Sarebbero necessari, però, ulteriori approfondimenti sugli effetti

dei regolatori di crescita, sulle fonti di azoto e di carboidrati e sui genotipi, in maniera tale da definire i loro ruoli nell'embriogenesi somatica.

I vantaggi offerti dall'embriogenesi somatica sono molteplici, ad esempio, mentre, la micropropagazione permette di ottenere un milione di piante l'anno, partendo da un singolo espianto (Boxus, 1974), l'embriogenesi somatica, legata con la tecnologia del "seme artificiale", potrebbe fornire milioni di "semi sintetici" di fragola in poche settimane. Inoltre, i diversi stadi dell'embriogenesi somatica, molto simili a quelli dell'embriogenesi zigotica, possono essere ottenuti in modo sincrono in grandi quantità e gli embrioni somatici ottenuti, privi delle protezioni presenti nel seme, possono essere manipolati chimicamente e fisiologicamente (Sung *et al.*, 1984).

1.2.3 La propagazione della fragola attraverso la morfogenesi indiretta

Come già riportato precedentemente, nella morfogenesi indiretta si ha la rigenerazione di germogli e di embrioni avventizi attraverso la proliferazione del callo. Utilizzando questo tipo di rigenerazione, aumenta la possibilità di avere variazioni genetiche nelle piante prodotte. Per la propagazione della fragola, questo tipo di rigenerazione viene riportata da vari autori a partire da diversi tipi di espianti: Rosati *et al.* (1975) e Quarta *et al.* (1991) hanno ottenuto la rigenerazione partendo dalle antere; Nehra *et al.* (1990) hanno utilizzato il callo derivato da foglie immature; Rugini and Orlando (1992) hanno riportato un efficace metodo per la rigenerazione da stipole; Damiano *et al.* (1995) hanno esaminato la stabilità genetica di cinque diverse cultivar di fragole rigenerate. Nella **tabella 3** sono riportati i terreni e le composizioni ormonali utilizzate dai vari autori.

Nel 1995, Monticelli *et al.* individuarono le parti della foglia di fragola, con una minima produzione di callo, più competenti per la rigenerazione di nuove piante, sottoposte a determinati stimoli ormonali.

La rigenerazione indiretta a partire da antere consente la produzione di piante aploidi, molto utili nelle tecniche di miglioramento genetico. Le piante così ottenute sono prive di variazioni nel numero di cromosomi e mostrano la stessa capacità di essere micropropagate rispetto a quelle originate da meristemi o da apici vegetativi (Laneri and Damiano, 1980). Owen e Miller nel 1996 hanno ottenuto la rigenerazione di piante aploidi da colture di antera in tre cultivar americane di fragola, utilizzando un terreno molto simile a quello proposto da Boxus nel 1974. Il lavoro pubblicato da Blando *et al.* nel 1993

descriveva un efficace metodo per la coltura di sospensioni cellulari di fragola e per la successiva produzione di strutture rigenerative nella cultivar “Pajaro” attraverso la produzione di callo.

Tab. 3. Terreni ed ormoni usati per la rigenerazione indiretta della fragola

NUTRIENTI	REGOLATORI DI CRESCITA	ESPIANTO	BIBLIOGRAFIA
MS ^a	Callog.: BA 5 µM + 2,4D 5 µM Rigener.: BA 10 µM + NAA 1 µM	Foglie immature	Nehra <i>et al.</i> , '90
GD ₃ ^b	Callog.: Kin 23 µM Rigener.: Kin 15 µM	Antera	Quarta <i>et al.</i> , '91
MS + Gamborg <i>et al.</i> , '68	BA 10 µM + IBA 2,5 µM	Stipole	Rugini e Orlando, '92
Callog.: GD ₁ ^c Rigener.: GD ₃ o B5 ^d	Callog.: NAA 2 mg/l + Kin 5 mg/l Rigener.: BAP 1 mg/l + Kin 0,01 mg/l o BAP 0.2 mg/l + 2,4 D 0,5 mg/l	Antera	Damiano <i>et al.</i> , '95

^aMezzo di Murashige e Skoog, 1962.

^bMezzo di Gresshof e Doy, 1973.

^cMezzo di Gresshof e Doy, 1972.

^dMezzo di Gamborg *et al.*, 1968.

In conclusione si può affermare che la propagazione della fragola attraverso la coltura *in vitro*, come per le altre specie (Murashige, 1997), presenta vantaggi e svantaggi. L'aspetto più importante è rappresentato dalla possibilità di produrre grandi quantità di piante prive di malattie (milioni in un anno; una persona può produrre circa 400 piante al

giorno), in luoghi relativamente ristretti. Si è calcolato che ogni metro quadrato di spazio è in grado di “produrre” circa 25000-30000 piante per anno.

Il metodo descritto da Damiano (1980), per la coltura di meristemi di fragola, permette di produrre piante prive di virus; inoltre, i tubi di coltura contenenti gli espianti possono essere conservati per un lungo tempo, al fine di permettere una pianificazione dell'attività di un laboratorio industriale e la creazione di un germoplasma di fragola.

È inoltre da considerare il vantaggio economico che si ottiene dall'utilizzo di imballaggi ridotti (40000 piante pesano solo 15 Kg) e duraturi (4-6 settimane) (Boxus *et al.*, 1984). Le colture *in vitro* permettono di eliminare i ritardi dovuti al periodo di quarantena imposto dalla maggior parte dei paesi.

I vantaggi fin qui descritti aumentano quando vengono rispettati i seguenti parametri: 1) i test per evidenziare la presenza di virus sono effettuati sul maggior numero possibile di virus sconosciuti; 2) si ha totale sicurezza riguardo la produttività di un clone o delle varietà che si propagano; 3) si adottano le misure più efficaci contro gli insetti e le malattie, sia nella acclimatazione in serra che nei vivai. Tutto ciò è di fondamentale importanza se si considera che le colture *in vitro* non conferiscono nessuna resistenza alle piante.

Negli ultimissimi anni le tecniche di coltura *in vitro* si stanno dimostrando valide anche per l'induzione di simbiosi vantaggiose fra piante e batteri diazotrofici. Queste simbiosi artificiali potranno sostituire i fertilizzanti azotati sempre più costosi e necessari per le colture. Preininger *et al.* (1997), usando i metodi di coltura *in vitro*, hanno stabilito un'associazione stabile tra l'*Azomonas insignis* (un batterio azoto-fissatore) e la fragola. Poiché l'organogenesi prende origine da un ristretto numero di cellule, risulta più facile introdurre il batterio all'interno di queste poche cellule che non all'interno di un embrione. La rigenerazione di questo callo ha dato origine a piante contenenti il batterio e quindi capaci di fissare l'azoto.

1.2.4 Il miglioramento genetico della fragola attraverso le colture *in vitro*

Lo scopo principale di un programma di miglioramento genetico è l'ottenimento di una variabilità genetica entro la quale selezionare gli individui migliori per le qualità richieste. Le vie normalmente seguite sono l'incrocio e la mutazione, ma la manipolazione di cellule e tessuti vegetali ha rivoluzionato questi metodi tradizionali, perché ha permesso di ottenere una variabilità genetica al di là dei processi per via sessuale. Ciò è reso possibile, ad esempio, attraverso la coltura di callo e la successiva rigenerazione. È stato accertato, però, che la probabilità di insorgenza della variazione genetica è relativamente più bassa nella rigenerazione per embriogenesi rispetto a quella per organogenesi (Ogura, 1990).

Nel caso della fragola questi tipi di approcci, non sessuali, per il miglioramento genetico risultano di particolare importanza vista la natura ottoploide, l'origine interspecifica e l'alta eterozigosità della specie (Jelenkovic *et al.*, 1991).

La coltura *in vitro* della fragola permette di selezionare, fin dalle prime fasi di sviluppo, le linee resistenti ai patogeni, prevalentemente fungini, accorciando notevolmente i cicli di lavoro rispetto ai metodi tradizionalmente adottati.

La variabilità indotta dalle colture *in vitro* è stata più volte dimostrata nel caso della fragola a livello di cellula, di callo e di tessuti organizzati derivati da rigenerazione. Diversi autori hanno descritto le variazioni genotipiche e fenotipiche ottenute con le colture *in vitro* di fragola. Nel lavoro condotto da Sansavini (1990) viene riportato lo studio sulla stabilità e sulla ereditabilità delle variazioni genetiche causate dalla micropropagazione ascellare di fragola. Quarta *et al.* 1991 riportarono che alcune piante di fragola rigenerate da colture di antere mostrano diversi fenotipi rispetto alla cultivar originale. Le piante presentavano foglioline allungate, piccioli accorciati e foglioline arricciate, foglie pubescenti, lamine fogliare spesse, foglie con clorosi o diversa epoca di fioritura. Anche nel lavoro di Jemmali *et al.* (1992) vengono evidenziati casi di variazioni verificatesi dopo la rigenerazione da stipole di fragola; Nehra *et al.* (1992) analizzarono le variazioni (minor vigore, piccioli più corti e foglie più piccole) riscontrate nella rigenerazione della cultivar "Redcoat"; la variabilità delle colture in sospensioni cellulari è stata confermata dal lavoro di Blando *et al.* (1993). Damiano *et al.* (1995), con ricerche su cinque diverse cultivar di fragola, hanno confermato che la rigenerazione comporta variazioni sia a livello genotipico che fenotipici. Le variazioni osservate riguardavano la velocità di crescita, l'efficienza di rigenerazione e alcuni sistemi enzimatici.

Nell'ambito del miglioramento genetico della fragola, il miglioramento per la resistenza alle malattie riveste una notevole importanza. In particolare, le colture *in vitro* di fragola sono state utilizzate per selezionare linee cellulari e cloni resistenti al patogeno *Colletotrichum acutatum* (Damiano *et al.*, 1986; Corazza *et al.*, 1994).

In generale, le tecnologie *in vitro*, fonte di variabilità genetica, stanno avendo sempre maggiore importanza nella salvaguardia della variabilità genetica, ormai compromessa dalla uniformità delle specie coltivate e dal depauperamento delle specie selvatiche. I recenti progressi possono essere riprodotti in provetta e nuove piante e nuove variazioni genetiche, che non esistono in natura, possono essere ottenute in breve tempo (Bajaj, 1990).

1.3 La trasformazione

1.3.1 Aspetti generali

La manipolazione genetica delle piante, utilizzando la tecnica degli incroci, è praticata dall'uomo da centinaia di anni e ha portato alla introduzione di molte nuove varietà vegetali con considerevoli e continui miglioramenti nelle rese e nella qualità delle coltivazioni (Chrispeels, 2000; Tabe, 1998; Bourlaug, 1997). Già nel Neolitico l'uomo coltivava piante che garantivano una maggiore resa produttiva fra le diverse varietà genetiche che la natura offriva, ad esempio oltre 20 varietà diverse di melo venivano coltivate ai tempi dei Romani e 43 varietà di riso erano presenti in Italia nei primi anni del 1800. Queste tecniche, tuttavia, sono estremamente lente e di utilità limitata considerando il numero esiguo di specie che è possibile incrociare. Non sono, inoltre, controllabili ed il risultato rimane piuttosto aleatorio, perché dipende dal trasferimento incontrollabile di geni per lo più sconosciuti. La tecnologia del DNA ricombinante odierna, basata su presupposti noti ed evidenze scientifiche provate, permette di imprimere una formidabile accelerazione al processo della selezione di nuove specie, superando ogni barriera di specie e modificando esclusivamente i geni desiderati (Birck, 1997). Dal primo trasferimento di geni eterologhi in piante di tabacco, descritto indipendentemente da tre gruppi di ricerca, nel 1984, i metodi di trasformazione di cellule vegetali si sono perfezionati e sono diventati sempre più affidabili. Ad oggi risultano trasformate con successo più di 120 specie vegetali diverse e numerose piante transgeniche o derivati di piante transgeniche vengono regolarmente commercializzate nel mondo (Collins, 1996; Pain, 2005). Nonostante una diffusa ostilità di larghi strati dell'opinione pubblica soprattutto europea riguardo alle piante transgeniche, è un dato di fatto che le piante transgeniche si stanno diffondendo rapidamente: basti pensare che negli USA le coltivazioni di mais transgenico hanno quasi completamente sostituito quelle di mais tradizionale (Leist, 1999; INRAN, 2004). In teoria la trasformazione vegetale offre l'opportunità di introdurre geni di qualunque origine nelle cellule vegetali. Queste cellule vengono, quindi, rigenerate producendo piante transgeniche che contengono ed esprimono la nuova informazione genetica desiderata (Duval, 1995; Engelmann, 1977; Betz, 2000).

Dicotiledoni

Il metodo più diffuso per trasferire geni esogeni nelle piante, si basa sull'uso di vettori di trasformazione derivati da *Agrobacterium tumefaciens* e da *A. rhizogenes*, due batteri normalmente presenti nel suolo che infettano le cellule di molte piante dicotiledoni. Questi due batteri infettando le cellule vegetali provocano, il primo, una formazione tumorale nota come “galla del colletto” ed il secondo la formazione di radici avventizie nella zona di infezione. La patologia dovuta ad *Agrobacterium tumefaciens* era già stata descritta oltre 2000 anni fa e si presenta come una forma tumorale a volte di notevoli dimensioni. Tali formazioni sono la conseguenza del trasferimento, da parte del batterio, di un segmento di DNA, chiamato T-DNA, che è parte di un grosso plasmide (chiamato Ti: induttore di tumore) presente nella cellula batterica, nel DNA nucleare della pianta (Hooykaas, 1992). I geni presenti all'interno del T-DNA, delimitato da due segmenti di DNA di 25 paia di basi, non soltanto vengono integrati stabilmente nel genoma nucleare della cellula trasformata e successivamente della pianta transgenica da essa rigenerata, ma vengono anche espressi e trasferiti alla progenie della pianta transgenica. Il T-DNA contiene geni che controllano la sintesi di enzimi coinvolti nella produzione di auxine e citochinine, ormoni vegetali che regolano il processo di divisione cellulare nei tessuti infettati della pianta. Inoltre, altri geni presenti nel T-DNA determinano la sintesi di alcuni derivati aminoacidici, chiamati opine (octopina, nopalina, agropina), variabili a seconda del tipo di *Agrobacterium*, e vengono prodotte esclusivamente nelle cellule trasformate della pianta e utilizzate da *Agrobacterium* come fonte di azoto e di carbonio (Verpoorte, 2000). In origine, utilizzando ceppi di *A. tumefaciens* di tipo selvatico, era estremamente difficile poter rigenerare piante trasformate dai tessuti tumorali. Una serie di manipolazioni del plasmide batterico Ti ha portato alla costituzione di diversi plasmidi modificati nei quali le sequenze di DNA responsabili della formazione tumorale sono state rimosse, mentre sono state conservate le sequenze che conferiscono al batterio la capacità di trasferire ed integrare il DNA all'interno del DNA nucleare (la cosiddetta regione "vir"). Per superare i problemi connessi con la espressione dei geni esogeni trasferiti nella pianta, sono stati inoltre costruiti vettori plasmidici che contengono geni chimerici, costituiti cioè da sequenze di DNA di diversa origine, come ad es. la sequenza del promotore della nopalina sintasi (gene "nos") e sequenze codificanti la sintesi della neomicina fosfotransferasi che conferisce la resistenza all'antibiotico kanamicina. La presenza del gene che conferisce resistenza alla kanamicina consente di selezionare le cellule

trasformate all'interno di una popolazione di cellule non trasformate per la loro capacità di crescere su terreni di coltura contenenti elevate concentrazioni dell'antibiotico.

Oggi sono disponibili diversi vettori plasmidici Ti derivati principalmente dall' *A. tumefaciens* per la trasformazione genetica di cellule vegetali. Uno tra i più utilizzati è un vettore "binario" costituito da due plasmidi uno dei quali (il plasmide helper) contiene le funzioni geniche necessarie per l'infettività di *Agrobacterium* (i geni di virulenza), mentre il secondo è disponibile per ricevere le sequenze di DNA esogeno da trasferire nella pianta. Una versione di tale vettore contiene anche un gene marcatore di origine batterica, il gene della glucuronidasi (GUS) che consente l'identificazione delle cellule trasformate mediante semplici colorazioni istochimiche (Jefferson, 1987).

Il metodo di trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium* è estremamente semplice, poco costoso ed efficiente in molti sistemi in cui è disponibile un efficiente protocollo di rigenerazione di piante da un tessuto coltivato *in vitro*. Consiste nel coltivare tessuti della pianta in presenza di *Agrobacterium* per alcuni minuti o fino a diverse ore e quindi, dopo gli opportuni trattamenti per rimuovere *Agrobacterium*, nel promuovere la divisione cellulare, la selezione e la rigenerazione delle cellule trasformate. Mediante *Agrobacterium* è stato possibile trasformare tessuti di foglia, radici, ipocotili, piccioli, cotiledoni, embrioni derivati da polline, semi e persino piante (Ceccherini, 2003; Chilton, 1977; De Maagd, 1999).

Monicotiledoni

Alcune specie di monocotiledoni economicamente importanti non sono suscettibili all'infezione di Agrobatteri, vengono perciò utilizzate altre strategie di inserzione quali la microiniezione, l'elettroporazione, la trasformazione di protoplasti o la trasformazione diretta mediante bombardamento con micro-proiettili (particle-gun).

Più recentemente sono stati selezionati nuovi ceppi iper-virulenti di *Agrobacterium tumefaciens* capaci di infettare anche le Monicotiledoni. Fra le specie transgeniche coltivate a scopi commerciali, soia e mais rappresentano le colture geneticamente modificate a più ampia diffusione (Suslow, 2002).

Trasformazione mediante bombardamento con microproiettili.

Un altro metodo molto utilizzato per eludere le restrizioni di specie imposte dallo spettro d'ospite di *A. tumefaciens* consiste nell'introdurre, direttamente in una cellula, DNA mediante il bombardamento di cellule o tessuti con microproiettili. La tecnica è basata

sull'accelerazione di microproiettili (generalmente d'oro o di tungsteno) ricoperti di DNA contro una cellula o un tessuto vegetale con una forza sufficiente ad attraversare la parete cellulare e la membrana. Una volta all'interno della cellula il DNA si dissocia dal suo supporto e si integra nel DNA della cellula. I microproiettili possono essere accelerati in vari modi, ma negli apparati attualmente in uso, ciò avviene per effetto di aria o elio compressi. I microproiettili penetrano nelle cellule veicolando il materiale genetico senza compromettere in modo irreversibile l'integrità delle cellule stesse in quanto le lesioni prodotte sono temporanee. I bersagli finora utilizzati con questa tecnica sono costituiti da sospensioni cellulari, calli, embrioni immaturi, porzioni di embrioni maturi, meristemi, pezzi di foglie, microspore, polline. Il principale vantaggio del metodo biolistico consiste nella possibilità di utilizzare come bersaglio persino espianti intatti riducendo e, in alcuni casi, eliminando l'impiego di calli e sospensioni cellulari. Ciò ha permesso di superare con successo le difficoltà di rigenerazione esistenti in molte specie vegetali. Particolarmente efficace si è dimostrato nei confronti delle specie recalcitranti alla trasformazione (cereali, legumi) o che risultano difficili alla rigenerazione utilizzando le tecniche disponibili di coltura *in vitro*. Un altro esempio è dato dalle specie arboree per le quali nella maggior parte dei casi l'infezione con *Agrobacterium tumefaciens* risulta inefficace quando è associata a sistemi di rigenerazione non particolarmente efficienti (Southgate, 1995).

1.3.2 Trasformazione in fragola

La flessibilità delle colture *in vitro* di fragola ha permesso di ottimizzare i protocolli di trasformazione per un gran numero di cultivar commerciali, quali Chandler, Camarosa, Elsanta e Pajaro. La prima trasformazione genetica della fragola coltivata è stata registrata nel 1990 da due gruppi indipendenti (James *et al.* 1990; Nehra *et al.* 1990b), entrambi utilizzavano un sistema *Agrobacterium*-mediato. Oggigiorno, esso è il metodo di trasformazione più impiegato, anche se sono state descritte tante altre strategie. Oltre alla fragola coltivata, la trasformazione è stata sperimentata con successo anche sulla fragola selvatica *F. vesca* (El Mansouri *et al.* 1996; Haymes and Davis 1998; Alsheikh *et al.* 2002) e su *F. moschata* (Mezzetti *et al.* 2002). In generale, la trasformazione su fragola è altamente genotipo dipendente.

Espianti

Diverse cultivar di fragola sono state trasformate eseguendo le infezioni con *A. tumefaciens*, con una percentuale di efficienza molto variabile: dallo 0.1% nella cultivar Rapella (James *et al.* 1990), al 58% nella cultivar Totem (Mathews *et al.* 1995). Nella maggior parte degli esperimenti di trasformazione, sia su fragole coltivate che su quelle selvatiche, sono stati utilizzati i dischi fogliari come espanti (James *et al.* 1990; Nehra *et al.* 1990b; El Mansouri *et al.* 1996; du Plessis *et al.* 1997; Martinelli *et al.* 1997; Barceló *et al.* 1998; Puite and Schaart 1998; Wawrzynczak *et al.* 2000; Alsheikh *et al.* 2002; Ricardo *et al.* 2003; Gruchala *et al.* 2004). Barceló *et al.* (1998) riportarono che i dischi fogliari dal semenzale della cv. Chandler erano trasformati con maggior facilità rispetto alle foglie dei germogli micropropagati in presenza di benziladenina (BA), probabilmente grazie alla maggior capacità rigenerativa dei tessuti giovanili. Comunque quando la BA era sostituita con la chinetina la percentuale di trasformazione era simile a quella ottenuta con le foglie giovanili. Nella cv. Rapella, i piccioli erano trasformati con maggior efficienza rispetto agli espanti di foglia, a dispetto della loro minor percentuale rigenerativa (James *et al.* 1990). Al contrario, i dischi fogliari di *F. vesca* danno una maggior percentuale di trasformazione rispetto ai piccioli (Alsheikh *et al.* 2002). Inoltre, anche le stipole di germogli micropropagati sono state trasformate con successo tramite le infezioni con *Agrobacterium* (Monticelli *et al.* 2002; Chalavi *et al.* 2003). Sezioni meristematiche ottenute dalla base di piantine proliferanti *in vitro* furono utilizzate come espanto per le cultivar Tristar e Totem (Mathews *et al.* 1995, 1998). Questi espanti contenevano sia gemme che frammenti di germogli. La percentuale di trasformazione su questi espanti era compresa tra 13.6 e 58.8 %, significativamente maggiore rispetto a quella ottenuta su espanti fogliari. In questo caso una selezione continua su kanamicina 25 mg l⁻¹ evidenziava come un'alta percentuale di rigeneranti trasformati era costituito da chimere, contenenti sia aree transgeniche che non transgeniche. Graham *et al.* (1995) anche utilizzarono tessuto di gambo dalla base delle piante coltivate *in vitro* di diverse cultivar, sebbene in questi casi la percentuale di rigenerazione su kanamicina 10 mg l⁻¹ era bassa.

Precoltura e virulenza di *Agrobacterium*

La precoltura degli espanti su terreno di rigenerazione, prima dell'infezione con *Agrobacterium*, può migliorare il processo di trasformazione incrementando il numero di cellule competenti per la rigenerazione e l'integrazione del transgene (Birch 1997). Nella

cv Chandler, un periodo di precoltura di dieci giorni sul terreno di rigenerazione era ottimale per ottenere germogli resistenti alla kanamicina (Barcelò *et al.* 1998). Assao *et al.* (1997) coltivarono espianti di foglia e picciolo per un giorno in un mezzo liquido prima dell'inoculazione di *A. tumefaciens*. In *F. vesca* è stata adottata una precoltura di due giorni degli espianti sempre su terreno di rigenerazione (El Mansouri *et al.* 1996; Alsheikh *et al.* 2002). Inoltre, è stato studiato l'aumento della virulenza di *Agrobacterium* nella trasformazione della fragola. Alsheikh *et al.* (2002) trovarono un aumento significativo di piante GUS positive in *F. vesca semperflorens*, aggiungendo l'acetosiringone (AS) durante la coltura di *A. tumefaciens*. Un incremento della percentuale di trasformazione fu evidenziato in espianti di *Fragaria* × *ananassa* infettati con batteri cresciuti con AS e acido indolacetico (IAA) (Gruchala *et al.* 2004). Al contrario, James *et al.* (1990) non rilevarono alcun effetto dell'AS sulla percentuale di espianti che produceva callo kanamicina-resistente dopo cento giorni di coltura. Sfortunatamente, l'efficienza di diversi ceppi di *A. tumefaciens* nella trasformazione della fragola ha ricevuto poca attenzione per cui non sono riportati studi comparativi in questo ambito.

Strategie di selezione

Anche il tipo di vettore utilizzato nella trasformazione influenza la percentuale di rigenerazione. La maggior parte dei vettori binari usati per la trasformazione della fragola derivano da pBIN19 (Bevan 1984) e contengono il gene *nptII* per la selezione dei germogli transgenici su kanamicina. In generale, i tessuti di fragola sono estremamente sensibili alla kanamicina. La rigenerazione di germogli da dischi fogliari diminuisce anche a basse concentrazioni di kanamicina, ad esempio 10 mg l⁻¹ (El Mansouri *et al.* 1996; Barceló *et al.* 1998; Gruchala *et al.* 2004), ma di solito viene impiegata una concentrazione di 25–50 mg l⁻¹ per evitare il rischio di selezionare germogli non transgenici. In molti protocolli, dopo l'infezione con *Agrobacterium* è incluso un periodo di 2-10 giorni senza kanamicina per permettere a singole cellule trasformate di esprimere i transgeni e di formare dei gruppi di cellule che sopporteranno meglio la pressione selettiva.

Come precedentemente menzionato, Mathews *et al.* (1995, 1998) trovò un'alta percentuale di chimerismo nei germogli rigenerati della cv Totem, utilizzando una selezione continuata su kanamicina 25 mg l⁻¹. Questo era probabilmente dovuto ad un'alta tolleranza all'antibiotico della cultivar, da quando i germogli non trasformati sono in grado di crescere e proliferare a questa concentrazione di kanamicina. Per recuperare trasformati non chimerici, questi autori hanno sviluppato un protocollo di rigenerazione nel quale

espianti da foglia provenienti da transgenici primari erano soggetti a tre cicli di rigenerazione, incrementando la concentrazione della kanamicina da 40 mg l⁻¹ nel primo ciclo a 80 mg l⁻¹ nel terzo (Mathews *et al.* 1998). I germogli rigenerati dopo questo processo erano in grado di crescere e radicare ad alte concentrazioni di kanamicina (120 mg l⁻¹). Monticelli *et al.* (2002) usarono una strategia simile per ottenere piante transgeniche uniformi con solo due cicli di rigenerazione. Un'alta percentuale di chimerismo è stata ottenuta anche da Chalavi *et al.* (2003), usando stipole come espianti, sebbene germogli chimerici diventavano bianchi dopo tre o quattro subcolture in presenza di kanamicina. Contrariamente a questi risultati, la presenza di chimerismo nelle fragole transgeniche, rigenerate da dischi fogliari, non è stato tuttora descritto e perciò sembra che una continua pressione selettiva, variando la concentrazione della kanamicina a seconda della sensibilità dell'espianto, sia sufficiente per l'ottenimento di piante transgeniche non chimeriche.

Eliminazione dei geni marcatori

Un problema sollevato sia dalle autorità competenti, per il rilascio di nuove varietà, che dai consumatori, per quanto riguarda le piante transgeniche, ha fin da subito riguardato aspetti legati alla presenza di geni marcatori che, soprattutto dai consumatori, vengono percepiti come portatori di possibili rischi per la salute. Da qui la necessità di rilasciare piante prive sia di geni marcatori che di sequenze geniche appartenenti al vettore utilizzato per la trasformazione genetica.

Oggi sono principalmente due i metodi impiegati per ovviare a queste problematiche: la trasposizione genica e la ricombinazione sito-specifica entrambi utilizzabili per la trasformazione della fragola, in quanto propagata per via agamica.

Recentemente piante di fragola transgeniche sono state ottenute senza geni marcatori usando appunto un sistema inducibile di ricombinazione sito-specifica. E' stato messo a punto un vettore binario contenente un gene della ricombinasi (R), adattato alle piante ed un marcatore bifunzionale creato dalla combinazione del gene *nptII* per la selezione con la kanamicina ed il gene *codA* che conferisce la sensibilità alla 5-fluorocitosina (5-FC) (Schaart *et al.* 2004). Entrambi i geni erano localizzati adiacenti e fiancheggiati da sequenze di ricombinazione ripetute e dirette (Rs). Quest'ultime a loro volta erano inserite tra un promotore forte come il 35S ed il gene *uidA*. L'espressione del gene della ricombinasi era indotto dall'applicazione del dexametasone (DEX), che attiva l'escissione delle sequenze fiancheggianti le Rs. Gli autori provarono due strategie per

recuperare piante “marker free”. Nella prima, gli espianti di foglia erano trattati col DEX per indurre l’attività della ricombinasi un mese dopo la selezione con la kanamicina e, successivamente, gli espianti erano coltivati in presenza della 5-FC per eliminare le cellule che ancora contenevano il marcatore di selezione. Nella strategia alternativa, i germogli erano rigenerati in presenza di kanamicina, e gli espianti di foglia di questi germogli transgenici erano trattati col DEX e successivamente erano soggetti ad un secondo ciclo di rigenerazione nel mezzo integrato con la 5-FC (Schaart *et al.* 2004). Questa strategia si dimostrò essere più efficiente rispetto alla selezione precedente, e più di trenta piante “marker free” furono selezionate. L’analisi molecolare di diverse di queste linee confermò che esse non contenevano geni marcatori.

Trasformazione genica diretta

Poiché la fragola era facilmente trasformata tramite infezioni di *Agrobacterium*, i metodi di trasformazione genetica diretta ricevettero poca attenzione in questa specie. Nyman e Wallin (1992) riportarono la trasformazione di foglie e piccioli di protoplasti attraverso l’elettroporazione, ottenendo una frequenza di trasformazione $1-5 \times 10^{-4}$ calli selezionati per piastra di protoplasti. Il bombardamento biolistico era usato da Wang *et al.* (2004) per trasformare calli di fragola derivanti da colture di antere. In questo studio, dopo quaranta giorni di selezione su 10 mg l^{-1} di fosfinotricina, erano registrati 5.4 calli resistenti per piastra di bombardamento. Nel caso di espianti di foglie, Cordero de Mesa *et al.* (2000) trovarono un segnale GUS transiente dopo cinque giorni dal bombardamento biolistico, sebbene non si formasse nessun callo in presenza di kanamicina. Quest’ultimi autori svilupparono un nuovo approccio per ottenere un’alta percentuale di trasformazione. Essi sottoposero gli espianti di foglia a bombardamento biolistico usando microproiettili rivestiti con cellule di *A. tumefaciens* invece che con il plasmide nudo. La percentuale di trasformazione aumentava dal 4%, quando veniva usata l’infezione standard con *Agrobacterium*, al 15% quando veniva usato il metodo combinato *Agrobacterium*-biolistico.

1.3.3 Genetica molecolare in fragola

Maturazione del frutto

In questi ultimi anni, diversi gruppi di ricerca si sono focalizzati sulla genetica molecolare della fragola, ed un certo numero di geni sono stati isolati e clonati. La maggior parte di queste ricerche sono state dedicate allo studio della maturazione del frutto, non solo per l'elevato interesse commerciale di questo processo, ma anche perché la fragola è considerata un ottimo sistema modello per studi fisiologici sullo sviluppo di frutti non climaterici (Manning 1994; Perkins-Veazie 1995). Il frutto della fragola si sviluppa dal ricettacolo fiorale, con il vero frutto, chiamato achenio, che invece cresce sulla superficie più esterna. Gli acheni regolano la crescita del ricettacolo attraverso la sintesi di auxine, e la maturazione è associata ad una graduale diminuzione delle scorte di auxina negli ultimi stadi della crescita (Perkins-Veazie 1995). Perciò, la maggior parte dei geni correlati alla maturazione sono inibiti attraverso trattamenti di auxina (Manning 1994, 1998). Manning (1998) isolò 66 cDNA (o geni putativi della maturazione), appartenenti a 26 famiglie di geni non ridondanti da frutti di fragola maturi e bianchi. Questi geni codificavano per proteine coinvolte in punti chiave di processi metabolici, quali la sintesi di antociani, la degradazione della parete cellulare e la respirazione. Nam *et al.* (1999) usarono *F. vesca* come sistema modello per studiare la maturazione della fragola. Essi costruirono una libreria di cDNA dai ricettacoli maturi deachenizzati, che fu analizzata differenzialmente con cDNA provenienti sia da frutti maturi che non maturi. Furono identificati 192 cloni registrati come attivatori della maturazione o trascritti repressori, nove dei quali furono analizzati in dettaglio. Apparentemente, questi cDNA (o geni putativi) erano direttamente correlati con la maggior parte dei processi di maturazione e l'analisi delle loro sequenze indicò un'ampia gamma di funzioni putative, quali la biosintesi di lipidi e amminoacidi, il metabolismo secondario e la produzione di aromi, e la risposta difensiva contro i patogeni. Diversi di questi geni furono anche espressi nelle fragole commerciali, sebbene il loro pattern d'espressione fosse leggermente differente.

La tecnologia del DNA microarray fornisce un potente mezzo per poter studiare in un singolo esperimento il profilo d'espressione di migliaia di geni. Aharoni *et al.* (2000) utilizzarono i microarray su fragola usando 1701 cDNA, che comprendevano 1100 sequenze EST (expressed sequence tags) e 601 cDNA non sequenziati, ottenute da frutti maturi con acheni. Questi microarray furono utilizzati per monitorare l'espressione genica nel frutto della fragola sotto diverse condizioni sperimentali, confrontando gli stadi di

sviluppo (Aharoni *et al.* 2000), i tessuti del ricettacolo con quelli dell'achenio (Aharoni and O'Connell 2002), i frutti trattati con quelli non trattati con l'auxina (Aharoni *et al.* 2002) e cultivar che differivano nella consistenza del frutto (Salentijn *et al.* 2003). Un gene che codifica per l'alcol acil-transferasi (SAAT), coinvolto nel sapore del frutto della fragola, fu identificato usando questa tecnologia (Aharoni *et al.* 2000). Questo gene fu introdotto nella petunia per verificare il suo potenziale intervento nella produzione di esteri volatili (Beekwilder *et al.* 2004). Inoltre, furono identificati altri geni che potrebbero essere coinvolti nella biogenesi dell'aroma (Iannetta *et al.* 2004; Moyano *et al.* 2004).

Uno dei più importanti eventi nella maturazione della fragola è il processo di ammorbidimento della polpa, poiché la rapida perdita di consistenza ne limita la conservazione dopo la raccolta. Generalmente si pensa che l'ammorbidimento del frutto sia principalmente dovuto all'azione di enzimi che modificano la parete della cellula. Diversi enzimi, coinvolti in questo processo, sono stati isolati. Le glucanasi, enzimi che modificano la rete delle emicellulose, sono state studiate in maniera esaustiva. Almeno due endo- β -1,4-glucanasi sono sovra-regolate durante la maturazione della fragola (Harpster *et al.* 1998; Llop-Tous *et al.* 1999; Trainotti *et al.* 1999; Woolley *et al.* 2001). Una di loro, *FaEG1*, è specifica nel processo di maturazione, mentre l'altro gene, *FaEG3*, viene espresso anche nel frutto verde e nel tessuto vegetativo giovane (Trainotti *et al.* 1999). Un gene specifico del frutto, la cui proteina è l'espansina, fu clonato da Civello *et al.* (1999). Si pensava che queste proteine rompessero i legami idrogeno tra le microfibrille di cellulosa ed emicellulosa, regolando l'accessibilità di altri enzimi al loro substrato. L'espansina della fragola non è sotto il controllo dell'auxina e apparentemente la sua espressione non è determinante nell'ammorbidimento del frutto. Sono stati studiati anche i geni correlati al metabolismo della pectina. Redondo-Nevado *et al.* (2001) riuscirono ad isolare un gene frutto-specifico che codifica per un'endo-poligalatturonasi (PG), espressa all'inizio della maturazione del frutto. Il suo modello d'espressione suggerisce un ruolo nel rilascio delle oligosaccarine, molecole biologicamente attive coinvolte nella maturazione del frutto, piuttosto che nella depolimerizzazione della pectina. Simili alla PG, le pectatoliasi anche catalizzano la degradazione delle pectine de-esterificate. Nella fragola sono stati identificati tre geni delle pectatoliasi collegati alla maturazione del frutto (Medina-Escobar *et al.* 1997; Benítez-Burraco *et al.* 2003), ed è stato osservato che la loro concentrazione veniva fortemente ridotta nei frutti maturi conservati in presenza di alte concentrazioni di CO₂, trattamento che ne estende la conservabilità e ne incrementa la consistenza.

La produzione di etilene non sembra essere associata con la maturazione della fragola e, perciò, questo frutto è stato classificato come non climaterico (Perkins-Veazie 1995). Comunque, alcune evidenze indicano che l'etilene potrebbe giocare un ruolo nella maturazione della fragola e che la riduzione della biosintesi dell'etilene potrebbe aumentare la conservazione dopo la raccolta.

Mathews *et al.* (1995) trasformarono la fragola con l'S-adenosilmetionina idrolasi del batteriofago T3. Questo gene limita la biosintesi di etilene riducendo il livello del suo precursore. Sebbene la presenza dei transgeni sia confermata all'interno delle piante transgeniche, Mathews e i colleghi non riportarono alcun effetto dell'espressione dei geni sulla conservazione del frutto. Un approccio alternativo per il controllo dell'ammorbidimento consiste nell'inibizione di proteine coinvolte nella degradazione della parete cellulare del frutto. Jiménez-Bermúdez *et al.* (2002) ottennero piante transgeniche dalla cv Chandler, contenenti una sequenza antisense del gene della pectato liasi. La maggior parte delle linee transgeniche produssero frutti significativamente più sodi rispetto al controllo allo stadio di massima maturazione. Inoltre, l'ammorbidimento dopo la raccolta era diminuita nel frutto transgenico, estendendo la loro conservazione. Per di più, la qualità della marmellata di fragola preparata con questi frutti transgenici era più alta come risultato di una minor degradazione dei tessuti del frutto durante il processo di cottura della marmellata (Sesmero *et al.* 2007). Contrariamente a questi risultati, l'inibizione dei geni della cellulasi non modificano sostanzialmente l'ammorbidimento della fragola. Woolley *et al.* (2001) inibirono l'espressione del gene della cellulasi *Cel1* tramite la trasformazione della sequenza senso e antisense. Questo gene è espresso specificatamente nei frutti in maturazione, ma la sua inibizione non riduceva né l'attività della cellulasi né l'ammorbidimento del frutto. L'inibizione antisense di *Cel2* non modificò la fermezza del frutto (Pliego-Alfaro *et al.* 2002).

Altri geni sono stati clonati, incluso una di-idroflavonolo-4-reduttasi (Moyano *et al.* 1998) coinvolta nella sintesi degli antociani, una D-galaturonase-reduttasi, la cui espressione è correlata con il contenuto dell'acido ascorbico (Agius *et al.* 2003), la HyPRP (Blanco-Portales *et al.* 2004), proteina a basso peso molecolare della famiglia delle "heat shock protein" (Medina-Escobar *et al.* 1998), una proteina legante l'auxina (Lazarus and Macdonald 1996) e due geni che rispondono agli stress ambientali. La più recente è una proteina kinasica calcio-dipendente (Llop-Tous *et al.* 2002) e una proteina che trasporta i lipidi (Yubero-Serrano *et al.* 2003).

Oltre alla maturazione del frutto, sono stati studiati a livello genetico altri processi fisiologici. Geni differenzialmente espressi nelle piante acclimatate al freddo sono stati isolati da Ndong *et al.* (1997). Recentemente sono stati identificati due geni che sono coinvolti nella risposta immunitaria in fragola. Martínez *et al.* (2005) isolarono una fitocistatina espressa nelle foglie adulte, nelle radici e negli acheni, che mostrava un'attività antifungina *in vitro* contro *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum*. Mehli *et al.* (2004) hanno riportato la scoperta di un gene codificante per una proteina inibente le poligalatturonasi. Questo gene è altamente espresso nel frutto maturo e viene indotto in seguito a inoculazione con *B. cinerea*.

I promotori

In fragola analisi funzionali su promotori omologhi sono scarse. Spolaore *et al.* (2003) studiarono i promotori dei geni delle endoglucanasi, *FaEG1* and *FaEG3*, usando l'espressione transiente, metodo che consiste nell'iniettare nel frutto una sospensione di cellule di *Agrobacterium* contenenti plasmidi che possono essere analizzati. Agius *et al.* (2005) svolsero esperimenti di espressione transiente per studiare l'attività del promotore della D-galatturonasi reductasi, usando il sistema biolistico. Fragole transgeniche sono state generate per valutare l'efficienza dei promotori eterologhi. Seguendo queste linee, Schaart *et al.* (2002) provarono un promotore del ricettacolo della petunia (*FBP7*) per valutare la sua competenza come promotore frutto-specifico in fragola. Le piante transgeniche mostrarono attività GUS nei tessuti riproduttivi ma non in quelli vegetativi, sebbene nel frutto rosso il promotore 35S sia più forte del promotore *FBP7*. Cordero de Mesa *et al.* (2004) analizzarono l'espressione del promotore 35S nei fiori e nel polline delle piante transgeniche. Essi trovarono un incremento dell'attività GUS nel polline maturo e nei granuli conservati per cinque settimane a 25 °C. Infine, al fine di raggiungere la tolleranza alle malattie causate dai fitoplasmi, procarioti utilizzati per individuare alcuni elementi, Zhao *et al.* (2004) testarono un promotore floema specifico isolato da *Arabidopsis*. In questo caso, l'attività GUS era ristretta ai tessuti floematici delle piante transgeniche.

Stress biotici

Resistenze a malattie e infestazioni sono due dei principali problemi della coltivazione di fragola. Questa coltura ha bisogno quasi sempre di una completa sterilizzazione del suolo per assicurarsi una buona raccolta dei frutti, che veniva ottenuta

con fumigazioni di bromuro di metile. Proprio per i suoi effetti negativi sull'ambiente, l'uso di questo composto è stato proibito nella maggior parte dei paesi con il Protocollo di Montreal. Una completa mancanza di fumigazione potrebbe avere un maggior impatto sulle industrie di fragola, con una perdita sul raccolto stimato intorno al 35–50% (Sjulin 2003). Un grande sforzo è stato compiuto in tal senso grazie all'introduzione di varietà resistenti.

Un resoconto sulle principali infestazioni di fragola e sullo stato delle resistenze nelle specie coltivate e selvatiche è stato redatto da Roskopf (1999). Le piante transgeniche di fragola con geni resistenti alle malattie potrebbero aiutare ad affrontare questo problema a lungo termine. Inoltre, questa tecnologia potrebbe ridurre l'uso di pesticidi, a favore della sicurezza e della qualità di questa coltura.

Tra i tanti patogeni della fragola, i funghi sono i più importanti in termini di danni alle colture. Le maggiori malattie fungine includono marciumi dell'apparato radicale (*Phytophthora fragariae* e *P. cactorum*), l'avvizzimento fogliare da *Verticillium*, vaiolatura fogliare (*Mycosphaerella fragariae*), maculatura rosso-bruna fogliare (*Diplocarpon earlianum*), mal bianco (*Sphaerotheca macularis* f. sp. *fragariae*), la muffa grigia (*Botrytis cinerea*), l'antracnosi (*Colletotrichum* spp.) (Maas 1998; Roskopf 1999). Poche di queste malattie sono state oggetto dell'ingegneria genetica. Chalavi *et al.* (2003) introdussero un gene per la chitinasi di *Lycopersicon chilense* nella cultivar Joilette, per favorire la resistenza al *Verticillium dahliae*. Le tre linee transgeniche ottenute mostravano un alto livello d'espressione dell'mRNA della chitinasi e una significativa diminuzione nella percentuale d'infezione della corona. I sintomi dell'avvizzimento erano leggermente inferiori in due linee transgeniche rispetto al controllo. Asao *et al.* (1997) ottenne una fragola transgenica con un'elevata resistenza a *Sphaerotheca humuli* attraverso l'espressione del gene della chitinasi del riso. L'estrazione delle proteine da foglie transgeniche mostrarono un aumento dell'attività della chitinasi tre volte maggiore rispetto al controllo. Dopo l'inoculazione con le spore fungine, la percentuale delle foglie che presentavano sulla loro superficie i sintomi della malattia si riducevano dal 40% nel controllo al 22% nelle piante transgeniche. Apparentemente, c'era una correlazione tra l'attività chinasica e le lesioni sulla foglia. Le caratteristiche morfologiche, come il prodotto delle piante transgeniche, erano simili al controllo e, inoltre, non furono individuati effetti significativi sull'ambiente, in particolare sulla crescita di altre piante e della microflora (Asao *et al.* 2003). La Taumatina II, prodotta dal *Thaumatococcus*

danielli, è una proteina patogenesi-correlata mostrante un'attività anti-fungina, di gusto gradevole e ultimamente è stata introdotta nella fargola cv Firework (Shestibratov and Dolgov 2005). Le piante transgeniche presentavano un'elevata resistenza alla *Botrytis cinerea*, saggiate con il test del disco fogliare.

Recentemente, Vellicce *et al.* (2006) descrissero l'ottenimento di piante transgeniche che sovra-esprimevano il gene della chitinasi proveniente dal *Phaseolus vulgaris*. Le piante transgeniche mostravano una notevole resistenza a *Botrytis* ma non verso *Colletotrichum acutatum*. Le piante della cv Camarosa sono state trasformate con un gene della chitinasi di un fungo del suolo, gen. *Trichoderma*, per ottenere la tolleranza al *Colletotrichum* (Yubero-Serrano *et al.* 2002). Diverse linee transgeniche presentavano una riduzione del marciume della corona da *Colletotrichum* rispetto alle piante controllo.

La resistenza agli insetti in fragola è stata realizzata con l'inserzione di geni "antifeedant". James *et al.* (1992) e Graham *et al.* (1995) ottennero piante transgeniche esprimenti un gene inibitore di proteasi di Cowpea (*CpTi*). Questo gene ha effetto su di un ampio spettro di Lepidotteri e Coleotteri. Come nel caso di altri inibitori di proteasi, esso forma un complesso con le proteinasi, inibendo l'attività proteolitica e impedendo perciò il normale sviluppo larvale (Watt *et al.* 1999). Le piante transgeniche esprimenti il *CpTi* sono state saggiate per la resistenza ai danni causati dalle larve del coleottero della vite (*Otiorynchus* spp.) con risultati contrastanti. Quest'ultimo è uno delle maggiori infestanti della fragola per il quale non è disponibile alcuna resistenza né nelle specie coltivate né in quelle selvatiche (Roskopf 1999). Nella relazione di James *et al.* (1992), l'analisi di sei linee transgeniche non mostrava alcuna riduzione nelle probabilità di sopravvivenza delle larve del coleottero della vite. Al contrario, Graham *et al.* (1997, 2002) notarono che le piante transgeniche erano meno danneggiate rispetto ai controlli quando venivano infettate con le larve del coleottero in serra ed in campo, senza significativi impatti su infestazioni di altro tipo. Anche il gene della lectina del *Galanthus nivalis*, codificante per una proteina insetticida, è stato introdotto in fragola, da solo o in combinazione con *CpTi*, sebbene le piante transgeniche non mostrassero alcuna resistenza agli attacchi del coleottero (Graham *et al.* 2002).

Nel caso dei virus, Finstad e Martin (1995) descrissero la trasformazione della fragola con un gene codificante per una proteina del capsido del virus della fragola che provoca l'ingiallimento del bordo fogliare, sebbene nessuna tolleranza al virus sia stata ancora riportata.

Piante transgeniche di fragola tolleranti al glifosato (N-fosfonometil-glicina), componente attivo dell'erbicida Roundup, è stato ottenuto da Morgan *et al.* (2002). Il glifosato inibisce la EPSP (enolpiruvil-scichimato-fosfato-sintasi), un enzima chiave nella via di sintesi degli aminoacidi aromatici. Questi autori trasformarono gli espianti di foglie con il gene dell'EPSP sintasi, trovato nel ceppo C24 di *Agrobacterium tumefaciens*, il quale è risultato essere tollerante al glifosato. Le piante transgeniche mostrarono una risposta molto variabile allo spray Roundup in termini di tolleranza, e furono selezionate 30 linee altamente tolleranti per prove di campo. Du Plessis *et al.* (1997) ottenne piante transgeniche resistenti al glufosinato attraverso l'espressione del gene fosfinotricina acetil transferasi. Quattro su ventidue linee erbicida-resistenti assomigliano al fenotipo di controllo quando sottoposte a prove di campo e a condizioni commerciali.

Stress abiotici

Diverse proteine LEA (Late Embryogenesis Abundant) sono state introdotte in fragola per incrementare la tolleranza al congelamento e al sale. Wang *et al.* (2004) produssero piante transgeniche esprimenti una proteina dell'orzo, la LEA3. Test di tolleranza al sale furono condotti su piante propagate *in vitro*. Essi osservarono che l'avvizzimento dopo sette giorni di coltura su terreno integrato con NaCl 50 e 100 mM era significativamente minore nelle piante transgeniche. La percentuale di sopravvivenza dopo l'esposizione al sale era anche maggiore nelle linee esprimenti la proteina LEA3. La sovra-espressione della deidrina acetica *wcor410*, isolata dal grano, una classe diversa delle proteine LEA, migliorò la tolleranza al congelamento delle foglie di fragola acclimatate al freddo (Houde *et al.* 2004). E' stato ipotizzato che queste proteine prevengono la destabilizzazione della membrana plasmatica che avviene durante il processo di disidratazione, associato al congelamento. Nelle tre linee transgeniche ottenute che esprimevano la proteina ad alti livelli, la soglia della temperatura che provoca danni da congelamento scese di 5 °C, da -12 a -17 °C. Comunque, quest'alta tolleranza non fu osservata nelle foglie non acclimatate al freddo, suggerendo che altri fattori potrebbero essere necessari per attivare le proteine WCOR410. Ugualmente, quando le piante intere venivano sottoposte a condizioni di congelamento, le piante transgeniche collassavano durante la fase di recupero a 20 °C, sebbene le foglie fossero in salute, indicando che le proteine WCOR410 non esercitavano alcun effetto benefico sulle radici. Owens *et al.* (2002) ottennero due linee transgeniche sovra-esprimenti un fattore di trascrizione indotto

dal freddo, il *CBF1*. La tolleranza al congelamento del disco fogliare era significativamente migliorata in entrambe le linee, ma quest'effetto non fu osservato nei ricettacoli.

Qualità del frutto e produttività

Diversi sforzi biotecnologici sono state rivolti nell'ambito del controllo della maturazione e nel ritardo dell'ammorbidimento del frutto. La produzione di etilene non sembra essere associata con la maturazione della fragola e, perciò, questo frutto è stato classificato come non climaterico (Perkins-Veazie 1995). Comunque, alcune evidenze indicano che l'etilene potrebbe giocare un ruolo nella maturazione della fragola, e, che la riduzione della biosintesi dell'etilene potrebbe aumentare la conservazione dopo la raccolta.

Mathews *et al.* (1995) trasformarono la fragola con l'S-adenosilmetionina idrolasi del batteriofago T3. Questo gene limita la biosintesi di etilene riducendo il livello del suo precursore. Sebbene la presenza dei transgeni sia confermata all'interno delle piante transgeniche, Mathews e i colleghi non riportarono alcun effetto dell'espressione dei geni sulla conservazione del frutto. Un approccio alternativo per il controllo dell'ammorbidimento consiste nell'inibizione di proteine coinvolte nella degradazione della parete cellulare del frutto. Jiménez-Bermúdez *et al.* (2002) ottennero piante transgeniche dalla cv Chandler, contenenti una sequenza antisenso del gene della pectato liasi. La maggior parte delle linee transgeniche produssero frutti significativamente più sodi rispetto al controllo allo stadio di massima maturazione. Inoltre, l'ammorbidimento dopo la raccolta era diminuita nel frutto transgenico, estendendo la loro conservazione. Per di più, la qualità della marmellata di fragola preparata con questi frutti transgenici era più alta come risultato di una minor degradazione dei tessuti del frutto durante il processo di cottura della marmellata (Sesmero *et al.* 2007). Contrariamente a questi risultati, l'inibizione dei geni della cellulasi non modificano sostanzialmente l'ammorbidimento della fragola. Woolley *et al.* (2001) inibirono l'espressione del gene della cellulasi *Cel1* tramite la trasformazione della sequenza senso e antisenso. Questo gene è espresso specificatamente nei frutti in maturazione, ma la sua inibizione non riduceva né l'attività della cellulasi né l'ammorbidimento del frutto. L'inibizione antisenso di *Cel2* non modificò la fermezza del frutto (Pliego-Alfaro *et al.* 2002).

Nell'ottica di incrementare la produzione del frutto, Mezzetti *et al.* (2004) trasformarono *F. × ananassa* e *F. vesca* con il gene chimerico *DefH9-iaaM*. Questo gene è composto da una regione regolativa del gene *DefH9* di *Antirrhinum majus* (bocca di leone), che ne promuove l'espressione nella placenta/ovuli, e la regione codificante dell'*iaaM* di *Pseudomonas syringae*, un gene produttore auxina. Le piante transgeniche mostravano un incremento nel numero delle infiorescenze ed, inoltre, più fiori per infiorescenza. Per di più anche la taglia e il peso del frutto erano aumentati. Infine, la produzione dei frutti fu incrementata del 180% nella fragola coltivata e del 140% in quella selvatica. Wawrzynczak *et al.* (2005), anche, modificarono il metabolismo dell'auxina nella fragola attraverso la trasformazione con un gene del mais, l'IAA-glucosio sintasi. Le piante transgeniche presentavano un fenotipo nano e questo fu parzialmente correlato ad un ridotto livello di IAA disponibile.

1.4 Il flusso genico

1.4.1 Aspetti generali

L'incorporazione di geni appartenenti a una o più popolazioni in un'altra popolazione è alla base del Flusso Genetico (FG). L'analisi delle conseguenze del FG da popolazioni di piante coltivate a piante selvatiche con esse compatibili o da piante coltivate a altre piante coltivate ha assunto nuovo interesse con l'introduzione nella pratica agricola delle Piante Geneticamente Modificate (PGM). Si distingue, quindi, tra:

- introgressione di un transgene da piante coltivate a piante selvatiche;
- presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di un transgene in coltivazioni convenzionali e biologiche per alimentazione umana e animale;
- presenza accidentale o tecnicamente inevitabile di un transgene in coltivazioni da seme convenzionali e biologiche (Arnaud *et al.*, 2003).

Il rischio di FG da una PGM a una pianta selvatica è legato al livello di FG possibile e all'eventuale vantaggio selettivo conferito dal transgene in condizioni naturali. E' possibile identificare transgeni capaci di produrre effetti positivi, negativi e neutri sulla capacità riproduttiva (*fitness*) delle piante che ne sono dotati. Come conseguenza, nell'analisi dell'impatto ambientale di un particolare transgene devono essere presi in considerazione sia la presenza di piante selvatiche sessualmente compatibili, sia il potenziale infestante delle piante dotate del transgene. La possibilità del verificarsi di incroci fertili tra piante coltivate e piante selvatiche è alla base del FG verso le piante selvatiche; in Europa in alcuni casi tale flusso può verificarsi (ad esempio per colza e barbabietola da zucchero), mentre in altri casi (mais e soia) l'assenza di piante selvatiche sessualmente compatibili con le piante coltivate rende impossibile il FG (Messeguer, 2003). In questa seconda situazione l'unica possibilità, a livello puramente teorico, di fuga dei transgeni dalle PGM è legata al trasferimento orizzontale da pianta a micro-organismo. Il FG da coltivazioni di PGM a coltivazioni convenzionali e biologiche per alimentazione umana o animale riguarda unicamente la presenza accidentale o tecnicamente inevitabile del transgene nel prodotto commerciale e non il trasferimento del transgene a piante selvatiche o, più generalmente, all'ambiente naturale circostante. Il problema pratico è quello di definire le distanze tra le PGM e le coltivazioni convenzionali e biologiche capaci di evitare il rischio di superare il livello di inquinamento da parte del transgene stabilito per legge (al momento 0,9% per le colture convenzionali) (Singh *et al.*, 2006).

Alla luce della crescente pressione da parte della popolazione e le maggiori aspettative sulla qualità della vita, la complessa rete del sistema alimentare si sta evolvendo per andare incontro alle necessità globali. Sia nei Paesi sottosviluppati che in quelli industrializzati, l'enorme incremento della popolazione ha portato anche ad un aumento della povertà, insicurezza alimentare e ad un impoverimento dell'alimentazione.

I progressi compiuti dalle scoperte scientifiche e dalle tecniche di laboratorio hanno portato ad un miglioramento in campo vegetale attraverso l'utilizzo di biotecnologie e dell'ingegneria genetica che hanno permesso di manipolare le risorse genetiche esistenti.

Le tecnologie transgeniche hanno permesso di migliorare le prestazioni agronomiche di molte colture importanti nell'alimentazione umana, animale e a fini industriali e/o farmaceutici. Contrariamente a questi alti tassi d'investimento, c'è molta preoccupazione per l'impatto delle colture geneticamente modificate sull'ambiente. La possibilità di contaminazione sia dell'ambiente che delle catene alimentari ha posto l'attenzione su come tali colture e le molecole che esse producono possano essere effettivamente isolate e contenute.

Uno dei passi successivi alla creazione di una pianta transgenica è quello di valutare i suoi benefici potenziali e i rischi per l'ambiente e se questi possano essere comparati con quelli derivanti dalle pratiche agricole tradizionali. L'approccio precauzionale nella gestione del rischio delle PGM rende necessario il monitoraggio delle popolazioni selvatiche ed infestanti che potrebbero essere soggette a trasmissione dei transgeni. La valutazione del rischio effettivo e i meccanismi di monitoraggio sono i requisiti basilari per impostare un'adeguata struttura legislativa per individuare efficacemente i rischi presenti e futuri. Diverse agenzie in differenti Paesi monitorano il rilascio degli organismi GM o formulano linee guida per adeguate applicazioni degli organismi ricombinanti nelle agro-industrie, così da assicurare l'utilizzo in sicurezza di questi organismi e nello stesso tempo progredire verso uno sviluppo globale e responsabile.

Per potenziare la richiesta di cibo, incrementando il prodotto delle coltivazioni, le piante sono state sottoposte a modificazioni genetiche tanto che oggi esse sono una nuova realtà mondiale ed appaiono in molti prodotti alimentari trasformati (Perr 2002). Negli ultimi quindici anni, infatti, molte tra le colture convenzionali sono state geneticamente modificate con le tecniche del DNA ricombinante e sono state rese disponibili piante che presentano caratteristiche migliori quali: un aumento del periodo di conservazione, maggiori valori nutrizionali, tolleranza agli erbicidi, resistenza ai patogeni

e agli insetti, e la tolleranza alle più svariate e severe condizioni ambientali (Engel *et al.* 2002; König *et al.* 2004). Secondo i dati fino ad ora raccolti (ISB News report 2001), questi alimenti sono sostanzialmente equivalenti alle controparti convenzionali.

Nel 1996, le colture GM furono per la prima volta introdotte nei mercati degli Stati Uniti e furono rapidamente adottati dagli agricoltori. Grande successo fu raggiunto con l'aumento della produttività agricola per soddisfare le necessità dell'uomo del XX secolo, dovuto alla loro introduzione (Yan and Kerr 2002; Rommens *et al.* 2004). Perciò, le colture GM sono state la tecnologia più rapidamente utilizzata nella storia dell'agricoltura e delle biotecnologie alimentari (Huang *et al.* 2002; Halpin 2005). Comunque, l'attuazione dell'ingegnerizzazione genetica nelle piante alimentari ha portato ad una considerevole preoccupazione per quanto riguarda i loro effetti sull'ambiente in termini di stabilità e sicurezza. E' risaputo che qualsiasi innovazione tecnologica porta rischi e benefici all'ambiente e che nessuna tecnologia è assolutamente sicura. Questo vale anche per le piante geneticamente modificate, tanto che le nuove caratteristiche incorporate nelle coltivazioni transgeniche dovrebbero essere valutate tenendo presente sia la sicurezza ambientale e alimentare, sia gli aspetti etici.

Le piante GM contengono geni inseriti artificialmente (transgeni), provenienti da specie correlate o completamente diverse, attraverso le tecniche avanzate dell'ingegneria genetica (Pereira 2000; Bock and Khan 2004). Usando vari approcci, recentemente sono state create diverse varietà di colture GM che hanno ricevuto l'autorizzazione per il rilascio nell'ambiente e per un uso commerciale (Tab. 4) (Nap *et al.* 2003).

Per valutare il rischio potenziale dell'utilizzo di piante transgeniche in agricoltura è importante determinare il destino del transgene nell'ambiente rispetto alla sua stabilità ed influenza sull'umanità. I dati provenienti da studi sulla sorte del DNA batterico nudo ingegnerizzato, introdotto in un suolo maturo (Lorenz and Wackernagel 1987; Khanna and Stotzky 1992), indicano che il DNA libero può resistere a lungo e mantenere un'attività di trasformazione. Questo aumenta la possibilità che il rilascio del DNA durante la coltivazione di specie geneticamente modificate e/o durante la fase di decomposizione di tessuti vegetali potrebbe stabilizzarsi nelle particelle del suolo e persistere per parecchio tempo.

Studi recenti in diversi laboratori di tutto il mondo hanno dimostrato che il DNA esogeno può essere trasferito, benché in bassissime frequenze, da varie piante transgeniche (barbabietola da zucchero, patata, tabacco) ai batteri del suolo (*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas stutzeri*) (Nielsen *et al.*, 2000; de Vries *et al.* 2003). Comunque, gli autori

hanno chiaramente indicato che le tante barriere fisiche e biologiche possono intralciare il trasferimento genetico orizzontale tra organismi così distanti, per cui il rischio di diffusione dei tratti transgenici (geni o frammenti di DNA) dalle colture GM ai batteri del suolo sono del tutto trascurabili.

Tab. 4. Alcune delle colture GM rilasciate nell'ambiente per uso commerciale.

Coltura	Tratti fenotipici	Transgene	Metodo di introduzione del transgene
Cotone (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Tolleranza all'erbicida glifosato	Gene mutante EPSPS	Trasformazione <i>Agrobacterium</i> -mediata
	Tolleranza all'erbicida bromoxynil e ioxynil	Gene bxn	
	Resistenza ai lepidotteri	Gene Cry1Ac	
	Tolleranza all'erbicida sulfonilurea	Gene ALS	
	Tolleranza all'erbicida fosfinotricina (PPT)	Gene bar	
Mais (<i>Zea mays</i> L.)	Tolleranza all'erbicida glifosato	Gene mutante EPSPS	Bombardamento con microproiettili di cellule o tessuti vegetali
	Tolleranza all'erbicida fosfinotricina (PPT)	Gene bar	
	Resistenza al baco del grano europeo (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	Gene Cry1Ab	
Patata (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	Resistenza allo scarafaggio del Colorado (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	Gene Cry3A	Trasformazione <i>Agrobacterium</i> -mediata
	Resistenza al virus Y della patata (PVY)	Gene del capsido virale	
Soia (<i>Glicine max</i> L.)	Tolleranza all'erbicida glifosato	Gene mutante EPSPS	Bombardamento con microproiettili di cellule o tessuti vegetali
	Alto contenuto nei semi di acido oleico	Un gene acido grasso denaturasi	
	Tolleranza all'erbicida fosfinotricina (PPT)	Gene bar	

In un altro studio viene presa in esame la β -glucuronidasi (GUS). Sia l'uomo che gli animali sono continuamente esposti alle proteine GUS provenienti dai batteri residenti

nel tratto intestinale e da fonti di cibo non transgenico, senza dar luogo ad effetti nocivi alla salute. La proteina della β -glucuronidasi, infatti, viene rapidamente degradata nelle condizioni esistenti nello stomaco (Fuchs and Astwood 1996). Perciò, il basso livello di proteine GUS provenienti dalle piante GM non è da considerarsi un pericolo in termini di tossicità e allergicità (Gilissen *et al.* 1998).

Recentemente, è stata osservata la capacità dei transgeni di passare dalle piante GM alle specie selvatiche. Durante il UK GM Science Review Panel (2003), il governo concluse che il trasferimento di DNA da piante GM ai batteri tra i diversi paesi è “improbabile che avvenga per una serie di barriere ben consolidate” e supportò questa posizione attraverso evidenze sperimentali. Dalla rassegna inoltre si concluse che il DNA transgenico non è diverso dagli altri DNA che vengono introdotti nella dieta giornaliera e che esso andrà incontro ad un destino simile (Heritage 2004). Netherwood *et al.* (2004) condussero uno studio nel quale a dodici volontari sani e a sette con una patologia all'ileostoma veniva somministrato un pasto contenente soia modificata con il gene per la resistenza al glifosato (EPSPS). Nei volontari sani, il DNA proveniente da materiale vegetale transgenico era degradato completamente, dopo il passaggio attraverso il colon. Invece in sei dei pazienti ileostomici fu ritrovato l'intero gene, identificato come prodotto di PCR; nel settimo, invece, fu stimato che circa il 4% del DNA transgenico introdotto con il test si accumulava nel liquido dell'ileostoma. Quindi, una discreta quantità di frammenti di DNA possono sopravvivere al passaggio nello stomaco in persone affette da patologie gastrointestinali. Questo studio aumenta i dubbi sull'importante questione correlata con la valutazione del rischio dei transgeni vegetali destinati ad un uso alimentare.

Sia i metodi tradizionali d'incrocio delle piante che le tecniche transgeniche creano nuove combinazioni di geni con caratteristiche innovative (resistenza ai patogeni e agli erbicidi), anche se un più alto grado di “novità genetica” è maggiormente presente nelle piante transgeniche che nelle cultivar tradizionali. I potenziali benefici ambientali di tali colture transgeniche possono essere classificati in quattro categorie:

(1) Riduzione dei costi di produzione ed incremento del raccolto. Alcune delle colture transgeniche, come il cotone, il frumento, la soia e il mais ne sono un esempio eclatante. Una coltura GM ben conosciuta, sviluppata dalla Monsanto, è il cotone Bt che produce una proteina anti-insetto (Cry1Ac) derivante da un batterio che si trova naturalmente nel terreno, il *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.). La produzione della proteina Cry1Ac nella pianta del cotone provvede alla protezione contro le infestazioni da insetti dell'ordine dei Lepidotteri inclusi i vermi della capsula del cotone,

“cotton bollworm” e “pink bollworm” (Wilson *et al.* 1994; Betz *et al.* 2000). I benefici primari del cotone “Bollgard” sono la riduzione dell’uso degli insetticidi, un miglior controllo delle infestazioni da parte degli insetti, un aumento del raccolto, riduzione dei costi di produzione, riduzione dei rischi di allevamento, aumento della crescita del cotone e di conseguenza un aumento del profitto per i coltivatori di cotone (Edge *et al.* 2001; Carpenter and Gianessi 2001; Betz *et al.* 2000). Quest’ultimi negli Stati Uniti ebbero un incremento della produzione di 117 mila tonnellate annue, che corrispondeva ad un aumento del profitto netto di 99 milioni di dollari (Carpenter and Gianessi 2001). Oltre 7200 tonnellate per anno in meno di insetticidi e 1575 milioni di tonnellate annue in più nella produzione di mais Bt sono state riportate dal National Center for Food and Agricultural Policy di Washington, DC, US (Govil 2004). Questi risultati illustrano chiaramente un decremento dell’uso dei pesticidi con un corrispondente miglioramento dell’ambiente insieme ad un aumento della produttività e dei costi di produzione.

(2) Riduzione dei composti chimici nell’ambiente. La riduzione nell’utilizzo di composti chimici per il controllo delle infestazioni è uno dei più evidenti benefici ambientali della coltivazione di piante transgeniche. Ogni anno circa 436.950 tonnellate di pesticidi sono stati applicati dai contadini americani, che potrebbero avvelenare il suolo, l’aria, le falde acquifere e l’intero ecosistema acquatico (Brown 2001). La maggior parte delle colture transgeniche come la soia, il grano, il cotone e la canola contengono geni per la resistenza alle infestazioni che corrisponde ad un significativo decremento nell’utilizzo di pesticidi (Betz *et al.* 2000).

(3) Monitoraggio ambientale e depurazione. Negli ultimi anni la depurazione o fitodepurazione dell’ambiente basata sulle piante è stata ampiamente perseguita come una tecnologia accreditata e rappresenta un’area d’intensa attività di ricerca. Le piante transgeniche sono state proposte come strumento per identificare e trattare l’inquinamento ambientale (Monciardini *et al.* 1998). Rugh (2004) riportò che molti taxa di piante posseggono particolari capacità intrinseche per la fitoestrazione di metalli o per la fitodegradazione di composti organici. Alcune specie considerate molto attive nella fitodepurazione sono state caratterizzate a livello fisiologico, biochimico e genetico per identificare i processi specifici per successive manipolazioni di miglioramento genetico. Nel perseguimento di questo obiettivo, *Arabidopsis thaliana* e *Tabacum nicotiana* sono state ingegnerizzate con transgeni non vegetali per potenziare l’efficacia della fitodepurazione contro inquinanti prioritari come i residui organomercuriali (Bizily *et al.*

1999), i solventi del tricloroetilene (Doty *et al.* 2000) e gli esplosivi nitroaromatici (French *et al.* 1999).

(4) Biofarmaci estratti dalle piante. La ricerca con le piante transgeniche offre la promessa di una produzione su larga scala di proteine sicure, pure e altamente efficaci dal punto di vista terapeutico, essenziali per la produzione di un ampio spettro di biofarmaci come gli anticorpi monoclonali (Mabs), enzimi, proteine del sangue e nuovi tipi di subunità dei vaccini. I biofarmaci, specialmente gli anticorpi monoclonali Mabs, sono tra i farmaci terapeutici più in crescita, con più di 200 prodotti impiegati nelle terapie cliniche (Fisher *et al.* 2003) per il trattamento di malattie mortali e croniche come l'artrite, il cancro, le infezioni, le infiammazioni e le malattie cardiovascolari.

1.4.2 Colture GM: regolamentazione

Le colture transgeniche affrontano una campagna intimidatoria con richieste di requisiti di pre-commercializzazione e restrizioni di mercato post-commercializzazione che le colture tradizionali abitualmente non subiscono, sebbene esse abbiano caratteristiche fenotipiche simili (Pew Initiative on food and Biotechnology 2004). I costi degli incontri per discutere delle normative restrittive del mercato, sono d'intralcio alla commercializzazione delle colture transgeniche (Bradford *et al.* 2005). Visti gli aspetti legati alla produzione e alla commercializzazione dei prodotti agricoli, dove non sempre la zona di produzione coincide con la zona di commercializzazione, pone l'attenzione sulla concertazione mondiale riguardo la regolamentazione e la legislazione delle coltivazioni GM. Per l'introduzione delle colture GM, un sistema di sicurezza con linee guida chiare, personale specializzato, procedimenti di revisione adeguati, e un controllo a valle da parte dei coltivatori e dei consumatori sono da considerarsi requisiti fondamentali.

Contrariamente ai potenziali benefici di questa nuova tecnologia per migliorare la qualità e la quantità della richiesta di cibo nel mondo, è aumentato l'interesse pubblico e scientifico sulla sicurezza ambientale ed alimentare delle colture GM. Per affrontare i cambiamenti delle colture GM molti Paesi hanno messo a punto dei sistemi di regolamentazione per assicurare la sicurezza e l'effettiva valutazione dei rischi connessi con queste colture (**Tab. 5**).

Tab. 5. Collegamenti internet mondiali sulle colture GM: informazioni, agenzie regolative e loro linee guida documentate per la pubblica sicurezza .

Sito Internet	Informazioni correlate
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_guidance/660_en.html	European Food Safety Authority
http://www.inspection.gc.ca/english/sci/biotech/tech/soisole.shtml	Canadian Food Inspection Agency
http://www.cfsan.fda.gov/~comm/biorpt.html	FDA/CFSAN—Report on consumer Focus Groups on Biotechnology
http://www.foodsafety.gov/~fsg/fssystem.html	FDA/USDA US food safety country report
http://www.geo-pie.cornell.edu/regulation/reg.html	US regulation of genetic engineering
http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome	United States Department of Agriculture
http://www.fao.org/documents/advanced_s_result.asp?QueryString=Food%20and%20agriculture%20and%20policy	Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO Corporate document repository)
http://www.food.gov.uk/gmfoods/	UK Food standards Agency—GM and Novel Foods
http://www.panna.org/	Pesticide Action Network North America (PANNA)
http://cls.casa.colostate.edu/TransgenicCrops/index.html	Transgenic crops: an introduction and resource guide
http://www.ers.usda.gov/Publications/	Economic Research Service United States Department of Agriculture
http://www.foodstandards.gov.au/	Food standards Australia, New Zealand
http://www.apeda.com/	Agricultural and processed food products export development authority, India
http://www.agnic.org/	The Agriculture Network Information Center (AgNIC Porta)

Sono in corso di valutazione applicazioni, caso per caso, per il rilascio nell'ambiente, soprattutto per quel che riguarda la diffusione incontrollata, il trasferimento dei transgeni, gli effetti sull'ambiente naturale, la suscettibilità alle malattie ed altri aspetti

delle colture GM [CAST (Council for Agricultural Science and Technology) 2000, 2001]. Nel 1987, il Giappone formulò e pubblicò le sue linee guida per quel che riguarda le applicazioni degli organismi derivati dalla tecnologia del DNA ricombinante in agricoltura, ambiente forestale, pesca, industria alimentare ed altre industrie correlate (MacKenzie 2000).

In Australia, la Commissione Consultiva sulla Manipolazione Genetica (GMAC) fu inizialmente istituita come corpo non statutario per sorvegliare lo sviluppo e l'utilizzo delle nuove tecniche di manipolazione genetica. Dal giugno 2001 esiste un nuovo regolamento, l'Atto della Tecnologia Genetica (GTA), che regola tutte le ricerche, la produzione e l'importazione della tecnologia genetica (MacKenzie 2000).

Diversi paesi asiatici sono in procinto di istituire strutture legislative per il rilascio commerciale e ambientale delle colture GM. L'India ha stabilito una Commissione di Approvazione dell'Ingegneria Genetica (GEAC) per monitorare le applicazioni delle colture GM. I regolatori devono essere in grado di riconoscere le colture GM accettabili e proporre cambiamenti alle pratiche agricole GM esistenti, per ottenere il giusto equilibrio richiesto dalla società. Gli alimenti geneticamente modificati sollevano molte questioni siano esse di natura scientifica che tecnologica, ambientale, sociale, etica, economica e politica (Jones 1999). Le interferenze con i nostri sistemi di produzione alimentare hanno sempre generato una preoccupazione generale nella popolazione. Il più grande cruccio dei consumatori riguarda i rischi. A complicare la valutazione dei rischi è la considerazione sulla riduzione dell'uso dei pesticidi, il decremento dei costi e l'aumento dei valori nutrizionali (Ferber 1999). I consumatori sono principalmente interessati alla composizione dei loro alimenti ed alla giusta scelta della qualità degli stessi. L'unico modo per garantire in maniera efficiente la gestione della qualità degli alimenti GM da parte dei produttori e delle autorità è attraverso l'etichettatura ed il controllo della filiera alimentare. All'interno della regolazione dell'etichettatura, in alcuni casi, essa viene richiesta solo in presenza di DNA o proteine esogene nell'alimento; in altri casi, come ad esempio nel caso dell'olio estratto da soia transgenica o da semi di rapa, non è necessaria alcuna etichettatura, poiché esso non contiene DNA o proteine. Gli alimenti transgenici richiedono l'etichettatura solo se essi differiscono significativamente nella sicurezza, nella composizione o nel contenuto nutrizionale, rispetto alle loro controparti "non-GM". Inoltre, la FDA richiede ad un alimento GM di essere etichettato se contenente un allergene conosciuto, a meno che non vi siano elementi che dimostrino che non esistano rischi di allergenicità (Randy 2001).

Nell'Unione Europea, il dibattito non si orienta sul fatto che gli alimenti GM debbano essere o meno etichettati, ma sulla modalità di etichettatura. Questa Agenda è incentrata sul diritto del consumatore di essere informato su tutte le questioni che riguardano l'alimentazione, prima dell'acquisto di un qualsiasi prodotto, in contrasto con le direttive americane dove le indicazioni sulla tracciabilità di un alimento sono del tutto parziali. Negli Stati Uniti, la FDA, se necessario, ha l'autorità di richiedere informazioni ulteriori sulla filiera dell'alimento per difendere i consumatori dall'essere ingannati o inavvertitamente intossicati (Degnan 1997). Nel 2001, la FDA propose linee guida per l'etichettatura volontaria degli alimenti, contenenti o meno ingredienti geneticamente modificati (Byrne 2004). Comunque, la curiosità dei consumatori potrebbe rappresentare una spinta efficace per i produttori, per le industrie e per i distributori nel fornire volontariamente informazioni attendibili e non ingannevoli sull'alimento. La FDA recentemente si è prodigata nel rendere disponibili piani regolativi per impostare linee guida sulla tracciabilità, per assistere i produttori che desiderano volontariamente etichettare i loro prodotti, in particolare sulla presenza o meno di ingredienti bio-ingegnerizzati (**Tab. 5**).

1.4.3 Valutazione del rischio delle colture GM

I rischi delle coltivazioni GM riguardano l'ecologia e la tossicologia sul rilascio e l'uso delle stesse. La valutazione del rischio di una coltura GM include alcuni dei maggiori argomenti come la sostenibilità, la globalizzazione, l'etica e la socioeconomia.

I rischi potenziali associati con la coltivazione e l'uso di piante transgeniche includono:

(1) Introduzione di proteine allergeniche o pericolose negli alimenti. L'ingegneria genetica è in grado di introdurre allergeni all'interno delle piante (Nordlee *et al.* 1996). Testare la tossicità degli alimenti diventa necessario quando una pianta produce composti endogeni o quando il prodotto transgenico ha un livello di tossicità riconosciuto. Test di tossicità sono richiesti per monitorare le proteine che non sono state trovate nell'alimentazione umana come le proteine GFP che trovano diversi utilizzi (Leffel *et al.* 1997). I prodotti genici che normalmente non sono allergenici potrebbero non diventare improvvisamente allergenici quando vengono espressi nelle piante transgeniche. Se il prodotto genico, invece, è un allergene conosciuto, poi esso sarà un allergene anche nella

pianta transgenica. Comunque, alcune strategie sono state sviluppate per prevenire l'attivazione della risposta immunitaria nell'uomo. L'enzima CP4 EPSPS introdotto nella soia per produrre una coltura erbicida-tollerante, fu testato per valutarne la tossicità (Harrison *et al.* 1996); questo enzima risultava rapidamente degradato durante la digestione e non mostrava tossicità. Tuttavia questi semplici test di tossicità non sembrano chiarire completamente il problema soprattutto perché sono necessarie ulteriori informazioni sulle relazioni tra la struttura delle proteine, la funzione e l'attività di sensibilizzazione.

(2) Effetti dannosi su specie non bersaglio e sull'ambiente. Le colture transgeniche che esprimono transgeni per il controllo delle infestazioni in agricoltura potrebbero anche colpire organismi non bersaglio (Hilbeck *et al.* 1998; Saxena *et al.* 1999). I rischi ecologici di rilascio delle piante transgeniche Bt potrebbero dare effetti tossici su organismi non infestanti, ma che anzi sono i predatori naturali dei parassiti delle colture e che perciò portano benefici all'agricoltura stessa. Le larve dei crisopidi che si nutrivano di bruchi che crescevano su una specifica varietà di frumento transgenico (Cry1Ab), mostrarono un incremento della percentuale di mortalità rispetto a quelle che si nutrivano di bruchi allevati su frumento non transgenico (Hilbeck *et al.* 1998). Comunque, questi problemi potrebbero essere direttamente correlati con l'applicazione della tossina Bt e non dovuti alla coltivazione di colture portanti il gene Bt, come evidenziato da studi sugli effetti dell'irrorazione della tossina Bt sugli organismi "nontarget" o sulle infestazioni (Janmaat and Myers 2003; Schoenly *et al.* 2003; Tabashnik *et al.* 1997).

(3) Incremento dell'invasività e dell'infestazione da erbacce delle colture. La rilevanza nel valutare le caratteristiche d'invasività quando si considera l'infestazione da parte delle colture GM è stata soggetto di molti dibattiti (Fitter *et al.* 1990). E' possibile che il rilascio di colture GM potrebbe risultare infestanti e perciò potrebbe andare ad aggravare l'onere degli agricoltori. In alcune colture, come *Medicago sativa*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, *Helianthus annuus* e *Oryza sativa*, che hanno alcune caratteristiche erbacee, potrebbero diventare ancora più infestanti e invasive una volta acquisiti alcuni caratteri transgenici (Raybould and Gray 1993; Regal 1994). Per affrontare questo problema, potrebbe essere utilizzata una miscela di erbicidi contenenti fino a cinque principi attivi (Bennett *et al.* 2004).

(4) La resistenza alle infestazioni. Il rilascio e la larga diffusione della coltivazione di piante GM, resistenti a malattie e infestazioni, ha accresciuto la preoccupazione che queste potrebbero imporre un'intensa pressione selettiva sulle popolazioni batteriche e infestanti tale che queste adottino dei meccanismi di resistenza. Un esempio è

rappresentato dai broccoli (*Brassica oleracea* L.), trasformati per resistere agli attacchi di un lepidottero (la falena diamante nero) che in seguito alla diffusione delle varietà transgeniche di tipo Bt hanno sviluppato una resistenza alle tossine Bt, applicate come misture microbiche su popolazioni in campo aperto (Tabashnik 1994).

(5) Impatto sulla biodiversità. Il timore per la perdita della biodiversità è un punto cruciale dell'opposizione di diversi gruppi ambientalisti molto influenti contro le coltivazioni GM. Essi ipotizzarono che la coltivazione di mais GM potesse rappresentare una minaccia per la diversità delle colture soprattutto nelle aree di differenziazione, dove maggiore era la diffusione di ecotipi locali (Oaxaca, in Messico). Uno studio su larga scala condotto riguardo alla perdita di biodiversità (rappresentata da ecotipi di mais) nella zona non evidenziò alcuna testimonianza sull'introggressione in ecotipi di mais locali. Questo fu un importante riferimento per i contadini locali e per le agenzie governative (Rissler and Mellon 1993). Lo studio, inoltre, affronta anche l'implicazione socioeconomica ed etica sull'uso delle colture GM (Garcia *et al.* 2005).

(5) Il rischio maggiore è rappresentato dalla possibilità di flusso genico tra le piante transgeniche e le specie spontanee o strettamente imparentate.

La principale via di dispersione genica dalle coltivazioni alle specie spontanee è rappresentata dal polline (Kareiva *et al.*, 1991; Ellstrand, 1992). La percentuale del flusso genico da polline può essere influenzata da fattori ecologici e genetici (**Tab. 6**). Per esempio, caratteristiche fiorali come l'auto-incompatibilità, l'alta percentuale di incrocio e la bio-impollinazione possono incrementare la probabilità di flusso genico (Fryxell, 1957).

Wang *et al.* (2004) studiarono la dispersione del polline nella festuca (*Festuca arundinacea* Schreb.) con esperimenti di campo. Essi posizionarono le piante transgeniche, contenenti il gene *gusA* e *hph*, al centro dell'appezzamento predisposto, mentre le non-transgeniche vennero poste tutte intorno in otto direzioni diverse, fino ad una distanza di 200 m. I semi prodotti vennero fatti germogliare e le piantine utilizzate per le analisi molecolari. I transgeni furono individuati in piante distanti fino a 150 m dal centro dove erano localizzate le piante transgeniche. Le frequenze transgeniche più alte furono osservate a nord dell'appezzamento centrale, la direzione prevalente del vento. Le più basse, invece, nelle altre direzioni, particolarmente a 100 m e a 150 m di distanza. Nessun transgene fu trovato a 200 m di distanza, in alcuna direzione. Quindi, il flusso transgenico può essere controllato posizionando le piantine transgeniche sotto vento ed incrementando la distanza da quelle non-transgeniche.

Tab. 6. *Fattori che determinano la probabilità d'introgressione di un gene da una coltura alle specie correlate.*

Barriere pre-zigotiche

1. Isolamento spaziale della popolazione parentale
2. Sincronia della fioritura
3. Direzione dell'incrocio (i genitori dai quali il polline e gli ovuli hanno origine)
4. Gli specifici genotipi parentali
5. Metodo di disseminazione del polline e presenza di vettori del polline
6. Competizione del polline dalla popolazione materna
7. Condizioni ambientali

Barriere post-zigotiche

8. Compatibilità mitotica dei due genomi parentali
9. Capacità dell'endosperma di supportare lo sviluppo dell'embrione ibrido
10. Direzione dell'incrocio (effetti materni sullo sviluppo del seme/frutto)
11. Numero e vitalità dei semi ibridi

Creazione di piante ibride

12. Dormienza del seme
13. Direzione dell'incrocio (effetti materni che influenzano la vigoria della pianticella)
14. Vigore nella crescita della pianta
15. Condizioni del habitat (naturale, rurale, coltivato)
16. Competizione con le altre piante
17. Influenza delle infestazioni, malattie, predatori

Propagazione delle piante ibride

18. Capacità di propagarsi vegetativamente
 19. Persistenza, disseminazione e invasività dei propaguli vegetativi
 20. Fertilità del polline e degli ovuli (stabilità meiotica e appaiamento cromosomico)
 21. Capacità di produrre sessualmente una progenie (auto/re-incrocio)
 22. Capacità di perpetuarsi nelle successive generazioni
 23. Numero dei semi, vitalità e dormienza
 24. Condizioni del habitat, competizione con le altre piante, infestazioni, malattie e predatori.
-

In letteratura esistono evidenze sperimentali sulla possibilità di flusso genico tra piante coltivate di fragola e i progenitori naturali. Ad esempio Westman *et al.* (2001) presero in esame una coltivazione di fragola (*Fragaria* x ananassa), situata a sud-est degli Stati Uniti, confinante con popolazioni di fragola native degli USA (*F. virginiana*), sue progenitrici. Essi esaminarono la variazione dei marcatori molecolari nel genere *Fragaria*, identificarono i marcatori presenti nella fragola coltivata e assenti/rari nelle popolazioni spontanee di *F. virginiana* isolate dalle aziende agricole di fragola. Inoltre, usarono 24 dei

marcatori specifici della varie cultivar della fragola coltivata per stimare la percentuale di flusso genico presente e passato tra la fragola coltivata e cinque popolazioni di *F. virginiana*, localizzate a 100 m fino a 7,5 km dai campi della fragola coltivata. L'ottanta per cento dei "marcatori delle cultivar" furono ritrovati nelle cinque popolazioni, incluso anche quei marcatori "esclusivi" delle cultivar moderne. I marcatori erano presenti con un'ampia varietà di frequenze, suggerendo differenze nella persistenza. L'utilizzo di marcatori molecolari (AFLP) ha, quindi, permesso di individuare ibridi molto vigorosi e fertili tra specie coltivate (*F. x ananassa*) e specie spontanee (*F. virginiana*).

Inoltre, molte piante, tra cui anche la fragola, producono frutti eduli appariscenti i cui semi vengono dispersi dagli animali anche a lunghe distanze. In confronto al flusso genico tramite il polline, i meccanismi di dispersione dei semi potrebbero, quindi, rappresentare un rischio maggiore (Ellstrand and Hoffman, 1990). Arnaud *et al.* (2003) studiarono il flusso genico, tramite la dispersione dei semi, tra coltivazioni di barbabietola da zucchero (*Beta vulgaris*) e specie parentali spontanee. Utilizzando marcatori cloroplastici (materni) e microsatelliti nucleari (biparentali) non osservarono un grande flusso genico dalle piante infestanti alle barbabietole, tramite dispersione di polline, mentre ebbero diverse prove di trasmissione di caratteristiche erbacee, tramite la dispersione dei semi.

II

SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo di strategie di miglioramento genetico non convenzionale quale l'ingegneria genetica ha trovato, negli ultimi anni, applicazione sia nella fragola coltivata F. x ananassa (Duch.) che nella fragolina di bosco F. vesca (L.), rendendo questo genere un interessante modello di studio tra le specie fruttifere perenni. In particolare, la trasformazione genetica di membri del genere *Fragaria* si è focalizzata sull'acquisizione di diversi caratteri, tra cui la resistenza al freddo (Owen *et al.*, 2003), la resistenza alle malattie (Chalavi *et al.*, 2003; Finstad and Martin, 1995) e l'incremento della produttività (Bachelier *et al.*, 1997; Mathews *et al.*, 1995).

Inoltre, la fragola si presta per le sue caratteristiche allo studio della trasmissione di transgeni ed all'analisi del rischio di flusso genico nell'ambiente. Questo rischio è considerato alto in specie che, proprio come la fragola, si incrociano facilmente, si propagano vegetativamente e presentano progenitori selvatici.

E' stato dimostrato che i transgeni possono essere trasferiti per autofecondazione dalla generazione R0 alla R1 sia in F. x ananassa (James *et al.*, 1990; Monticelli and Damiano, 2002) che in F. vesca (Haymes and Davis, 1998).

Ma come è stato già detto nell'introduzione il rischio maggiore è rappresentato dalla possibilità di flusso genico tra le piante transgeniche e le specie selvatiche.

La principale via di dispersione genica dalle coltivazioni alle specie selvatiche correlate è rappresentata dal polline (Kareiva *et al.*, 1991; Ellstrand, 1992). La percentuale del flusso genico da polline può essere influenzato da fattori ecologici e genetici. Per esempio, caratteristiche fiorali come l'auto-incompatibilità, l'alta percentuale di incrocio e la bio-impollinazione possono incrementare la probabilità di flusso genico (Fryxell, 1957).

Inoltre, molte piante, tra cui anche la fragola, producono frutti eduli appariscenti che vengono dispersi dagli animali anche a lunghe distanze. In confronto al flusso genico tramite il polline, i meccanismi di dispersione dei semi potrebbero, quindi, rappresentare un rischio maggiore (Ellstrand and Hoffman, 1990).

In letteratura esistono evidenze sperimentali sulla possibilità di flusso genico tra piante coltivate di fragola e i suoi progenitori naturali. In America, utilizzando dei

marcatori molecolari (AFLP), è stata documentata la presenza di ibridi molto resistenti e fertili tra specie coltivate e selvatiche (Westman *et al.*, 2001).

Il flusso genico tra specie coltivate e i loro progenitori selvatici potrebbero avere delle conseguenze importanti per la loro invasività e persistenza nell'ambiente. Per questo si rende necessario un'ulteriore indagine sul rischio di dispersione dei geni, determinando i fattori che influenzano l'estensione del flusso genico, come la stabilità d'espressione del transgene di generazione in generazione o la distribuzione geografica degli OGM e le specie selvatiche.

Gli obiettivi perseguiti in questo progetto sono stati i seguenti:

1. Incroci intra- ed inter-specifici con polline prodotto da piante transgeniche di fragola, messo a disposizione dal CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, e valutazione della vitalità degli ibridi.
2. Caratterizzazione delle piante transgeniche e della progenie per verificare l'ereditarietà dei geni esogeni e la loro eventuale stabilità d'integrazione nel genoma.
3. Trasformazione genetica di fragola (*Fragaria x ananassa* Duch. cv Selva, Egla e Belora) *Agrobacterium*-mediata: si è utilizzato un costrutto contenente il gene della Green Fluorescent Protein (*gfp*), come gene marcatore, e il gene della Polygalacturonase Inhibiting Protein (*pgip*), come gene d'interesse agronomico per la resistenza alle infezioni fungine, messo a disposizione dall'Istituto di Biologia e Biotecnologie Agrarie del CNR di Roma.

Si è scelto di utilizzare il *gfp* come gene marcatore, in quanto non distruttivo, diversamente ad esempio del gene *uidA*, la cui espressione viene rivelata da un saggio-istochimico (saggio GUS), e che quindi consente il monitoraggio dell'integrazione del gene stesso in qualunque fase di sviluppo della pianta.

Le PGIPs, invece, appartengono a una super famiglia di proteine modulari ricche di leucina ed è stato dimostrato che esse svolgono un ruolo di difesa dai funghi patogeni in diverse piante, in particolare anche in alcune cultivar di fragole, come "Elsanta", "Korona", "Polka", "Senga sengana" e "Tenira" (Mehli *et al.*, 2004), per cui sarà interessante provare ad introdurre il gene *pgip* in altre cultivar, come "Belora", "Selva" ed "Egla".

III

MATERIALI E METODI

3.1 Prove di incrocio

3.1.1 Piante donatrici di polline

Il materiale vegetale necessario per l'espletamento degli esperimenti d'incrocio è stato messo a disposizione dal CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma. Il polline proviene da piante di fragola trasformate in un lavoro antecedente. Le stipole delle cultivar "Egla" e "Teodora" sono state trasformate con due ceppi di *Agrobacterium tumefaciens* (**Fig. 3**), rispettivamente LBA4404, contenente il plasmide pBI 121 e C58C1, contenente il plasmide p35S GUS INT, entrambi ingegnerizzati con il gene reporter *uidA-int* e con il gene per la resistenza alla kanamicina *nptII*. Dalle stipole si sono avute le rigenerazioni descritte in **tabella 7** (Monticelli *et al.*, 2002).

Tab. 7. Trasformazione e rigenerazione da stipole.

Cultivar	I Rigenerazione	II Rigenerazione	III Rigenerazione	IV Rigenerazione
Egla	122	225	226a, 226b	-
Teodora	10	10a, 264	228, 230, 247, 252, 253, 257	430, 437

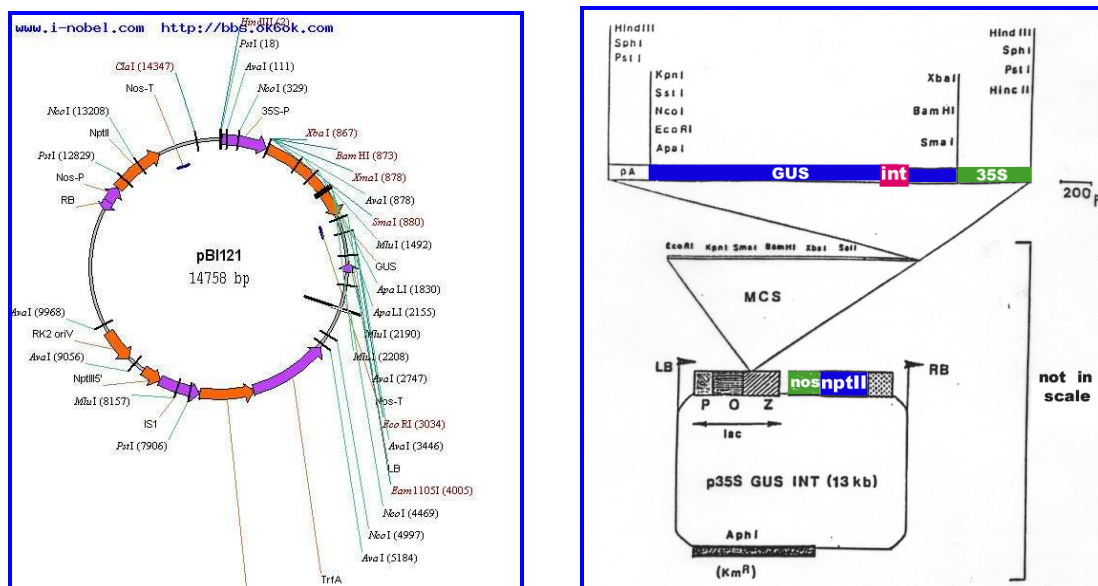


Fig. 3. Mappa dei plasmidi pBI 121 e p35S GUS INT.

Per le impollinazioni è stato utilizzato il polline di un clone transgenico ambientato in serra (clone '10'). Il polline, raccolto in antesi, è stato fatto maturare sotto una lampada ad incandescenza per circa tre ore per favorire la fuoriuscita dei granuli pollinici e poi conservato in frigo a 4 °C (**Fig. 4a, b**).



Fig. 4. Fiore di fragola prima dell'emasculazione (a) e dopo (b).

3.1.2 Piante portaseme

Gli incroci sono stati effettuati con diversi genotipi di fragola:

- *Clone 10*, trasformato con *nptII* e *uidA*, autoincrocio
- *F. x ananassa* (Duch.), ottoploide, cv Capitola
- *F. virginiana* (Duch.), ottoploide, un clone
- *F. chiloensis* (Duch.), ottoploide
- *F. moschata* (Duch.), esaploide, cv Capron Royal
- *F. vesca* (L.), diploide, cv Zimbaro (sud Italia)
- *F. vesca* (L.), diploide, cv Ilaria (nord Italia)
- *F. vesca* (L.), diploide, cv Snovit (Nord Europa)

3.1.2 Soluzioni e terreni di coltura

1. Vitalità e germinazione del polline:

- soluzione di diacetato di fluoresceina allo 0.5%;
- estratto di lievito 1 gL⁻¹, zucchero 100 gL⁻¹, acido borico 100 mgL⁻¹ e agar 10 gL⁻¹

2. Sterilizzazione degli acheni:

- acqua bidistillata e Tween 80 al 3%,
- alcool 70°,
- ipoclorito di sodio 2.45%,
- acqua sterile
- carta bibula sterile

3. Terreno di germinazione:

- terreno MS (Murashige and Skoog, 1962)
- saccarosio 30 gL⁻¹
- agar 8 gL⁻¹
- vitamine: acido nicotinico 1 mgL⁻¹, piridossina 1 mgL⁻¹, tiamina 10 mgL⁻¹, inositolo 100 mgL⁻¹, pH 5.6

4. Terreno di propagazione:

- terreno MS,
- vitamine MS,
- ormoni di crescita: GA₃ 0,1 mgL⁻¹, BAP 0,1 mgL⁻¹, IBA 0,3 mgL⁻¹,
- 3% di saccarosio,
- 0,5% di agar (pH 5.7)

5. Soluzioni per saggio GUS (Jefferson, 1987):

- K₃[Fe(CN)₆] (0.1 M)
- K₄[Fe(CN)₆] · 3 H₂O (0.1 M)
- Titriplex III (0.1 M)
- H₂PO₄
- X-gluc (acido glucuronico) 0.5 M
- pH 7.5

3.1.3 Prove di vitalità e germinazione su polline

La vitalità dei granuli di polline è stata saggiata immergendoli in una soluzione di diacetato di fluoresceina allo 0.5% e osservandone l'emissione della fluorescenza sotto una lampada ad UV. Sono stati messi a confronto i campioni più vecchi con quelli più nuovi per ciascuna pianta donatrice di polline.

La germinabilità è stata testata osservando lo sviluppo di tubetti pollinici al microscopio ottico, dopo l'incubazione su terreno di germinazione.

3.1.4 Impollinazione e raccolta degli acheni

Le impollinazioni sono state effettuate nel periodo che va da marzo 2006 fino a aprile dello stesso anno. I fiori delle piante riceventi sono stati preventivamente emasculati, per impedire impollinazioni incontrollate, fatta eccezione per alcuni fiori utilizzati come controllo (**Fig. 5**).



Fig. 5. Emasculazione dei fiori riceventi.

L'impollinazione è stata effettuata secondo lo schema riportato in **tabella 8**, utilizzando un pennellino, generalmente nelle prime ore del mattino, avendo cura di contraddistinguere i fiori impollinati (**Fig. 6**). L'operazione è stata ripetuta per due giorni consecutivi e poi, i fiori sono stati coperti per impedire impollinazioni incontrollate.

Tab. 8. Schema delle impollinazioni.

Pianta donatrice	Pianta portaseme	Ploidia	N. fiori impollinati
clone '10'	Clone '10'	8n	17
	<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8n	15
	<i>F. virginiana</i>	8n	20
	<i>F. chiloensis</i>	8n	8
	<i>F. moschata</i> , 'Capron Royal'	6n	24
	<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	2n	31
	<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	2n	21
	<i>F. vesca</i> 'Snovit'	2n	22



Fig. 6. Frutti derivanti da incrocio.

Gli acheni sono stati raccolti a maturazione e sottoposti a vernalizzazione (in frigo a 4°C).

3.1.5 Prove di germinazione su semi e micropropagazione delle piante

Una parte dei semi raccolti e sottoposti a vernalizzazione è stata utilizzata per le prove di germinazione previa sterilizzazione.

La sterilizzazione degli acheni è stata effettuata secondo la procedura di seguito riportata:

- un lavaggio di 10' in acqua bidistillata e Tween 80 al 3%,
- un lavaggio di 2' - 3' in alcool etilico 70%,
- un lavaggio di 15' in ipoclorito di sodio 2.45%,
- tre risciacqui in acqua sterile per 10' ed infine gli acheni sono stati fatti asciugare su carta sterile.

In seguito, i semi sono stati fatti germinare *in vitro* su terreno di germinazione, e propagati sempre *in vitro* su terreno di propagazione (vedi paragrafo 3.1.2).

3.1.6 Saggi GUS

Per verificare l'espressione del gene *uidA*, parte degli acheni e delle foglioline, derivanti dagli incroci, sono stati sottoposti a saggio istochimico (GUS assay) secondo il protocollo di Jefferson (1987), modificato.

Il gene *uidA* codifica per la β -glucuronidasi, enzima di *E. coli* la cui attività non è presente in molte piante; quindi se la pianta viene trasformata con questo gene, la localizzazione istochimica può essere effettuata immergendo i tessuti vegetali in una soluzione contenente il substrato, il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronide (X-gluc) e messi in incubazione tutta la notte a 37°C. Insieme ai campioni vengono sempre preparati anche i controlli positivi e negativi. I campioni positivi assumeranno, dopo decolorazione con EtOH a 70°, la caratteristica colorazione blu.

3.1.7 Selezione su kanamicina

Le piantine derivanti dagli incroci sono, poi, state testate anche per la resistenza all'antibiotico kanamicina. Esse, infatti, sono state in parte propagate *in vitro* su terreno di moltiplicazione e in parte trasferite su terreno di selezione contenente 50 mgL⁻¹ di kanamicina.

CAMERA DI CRESCITA



Incrocio Kn resistente



Incrocio Kn sensibile

Fig. 7. Selezione su kanamicina della progenie.

3.2 Analisi molecolari delle piante di fragola

3.2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato per le analisi molecolari proveniva rispettivamente da trasformazione (**Tab. 9**) e da incrocio con polline di piante trasformate (**Tab. 10**).

Tab. 9. *Rigenerazioni di fragola analizzate mediante Southern blotting, ottenute da trasformazione (Monticelli et al., 2002)*

Cultivar	I Rigenerazione	II Rigenerazione	III Rigenerazione	IV Rigenerazione
Egla	122	225	249, ,226a, 226b	
Teodora	10	10a, 264	228, 230, 247, 252, 253, 257	430, 437

Tab. 10. *Piante di fragola ottenute da germinazione di semi derivanti da incrocio con polline di piante transgeniche.*

Incroci (polline da clone '10', 8n)	N. campioni
<i>F. x ananassa</i> 'Teodora' (autoincrocio)	17
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola' (8n)	9
<i>F. virginiana</i> (8n)	16
<i>F. moschata</i> , 'Capron Royal' (6n)	138
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro' (2n)	190
<i>F. vesca</i> 'Ilaria' (2n)	29
<i>F. vesca</i> 'Snovit' (2n)	12
<i>F. chiloensis</i> (8n)	0

Come controlli negativi è stato estratto il DNA dalle due cultivar Egla e Teodora non trasformate.

3.2.2 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA, utilizzato sia per le reazioni di PCR che per il Southern blotting, è stato impiegato il protocollo di DOYLE & DOYLE (1987). E' stato prelevato 1 gr di tessuto fogliare dei campioni riportati in **tabella 9 e 10**, micro propagati *in vitro*. Il protocollo prevedeva le seguenti fasi:

1. Polverizzare i tessuti fogliari con azoto liquido in maniera tale da ottenere una poltiglia omogenea;
2. Mettere in ogni provetta 500 µl di buffer di estrazione (TRIS-HCl pH8 mM, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM, 2% CTAB, 0,4% β-mercaptoetanololo); posizionare la provetta alla temperatura di 65°C per 15 min;
3. Aggiungere un uguale volume di cloroformio-ottanolo, 500 µl, (proporzione 24:1), centrifugare i campioni a 8000 rpm per 5 min;
4. Recuperare il supernatante e aggiungere 10 µl di RNAsiA (10 mg/ml) (Sigma), mettere i campioni a 37°C per 30 min, in maniera tale che avvenga la digestione della soluzione;
5. Aggiungere altri 500 µl di cloroformio-ottanolo (24:1) in ogni campione, e centrifugare a 8000 rpm per 5 min;
6. Recuperare il supernatante e aggiungere isopropanolo alla concentrazione 0,8 v/v, quindi centrifugare i campioni a 13000 rpm per 10 min, in maniera tale da indurre la precipitazione del DNA sul fondo della provetta (pellet);
7. Aggiungere 200 µl di etanolo ed acetato d'ammonio, alla concentrazione del 75% , quindi centrifugare i campioni a 13000 rpm per 2 min; ciò permette il lavaggio del pellet in fondo alle provette;
8. Mettere i campioni in stufa alla temperatura di 37°C per 1 ora circa;
9. Il pellet così ottenuto viene diluito in 50 µl di TE buffer (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

Una volta estratto il DNA, i campioni sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio (Duchefa) allo 0,8 % in TBE (Tris Borate EDTA) 0,5X, con un voltaggio di 3 V per cm. per valutarne la qualità. I gel sono stati poi colorati in bromuro di etidio (1 mg/ml) (Sambrook *et al.*,1989), che permette di visualizzare i frammenti, legandosi al DNA per inserzione tra le basi appaiate; il colorante mostra un'intensa fluorescenza arancio/rossa, quando è illuminata da un fascio di luce ultravioletta, emessa da una lampada UV a 254

nm e fotografati sotto luce UV utilizzando l'acquisitore d'immagini digitale Gel Logic 100 Imaging System della Kodak (**Fig. 8**).



Fig. 8. *Acquisitore d'immagini digitale Gel Logic 100 Imaging System della Kodak.*

La concentrazione dei campioni è stata misurata utilizzando il fluorimetro (DyNA Quant, Hoefer, CA). Il principale vantaggio dell'utilizzo della fluorescenza rispetto alle misure di assorbimento è la maggiore sensibilità.

L'intensità della fluorescenza è linearmente proporzionale alla concentrazione dell'analita. Determinare la concentrazione dalla fluorescenza emessa da un campione richiede la calibrazione del fluorimetro con uno standard o l'impiego di una curva di lavoro.

Le soluzioni per la quantizzazione sono le seguenti:

1. fluoroforo bis-benzimide (Hoechst H 33258), 0.1 $\mu\text{g/ml}$,
2. buffer TNE (0.2 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4).

3.2.3 Analisi PCR

Tutti i campioni da cui è stato estratto il DNA, inclusi i controlli Egla e Teodora non trasformati, sono stati analizzati in PCR per la presenza dei geni *nptII* e *uidA* (Hamill *et al.*, 1991).

I primer utilizzati sono stati rispettivamente:

1. per *nptII*

- 5'-GAG GCT ATT CGG CTA TGA CTG (forward),
- 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA (revers),

2. per *uidA*

- 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG (forward),
- 5'-GTT TAC GCG TTG CTT CCG CCA (revers).

Ogni reazione, per ciascun campione, è stata condotta in un volume finale di 15 μ l contenente:

- ❖ 25 ng di DNA
- ❖ 1 mM di Tris-HCl a pH 9, 5 mM di KCl, 1,5 mM MgCl₂ che costituiscono il tampone di reazione della Taq.
- ❖ 0,5 unità di Taq polimerasi (Invitrogen)
- ❖ nucleotidi (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 200 μ M (Invitrogen)
- ❖ primer 2 μ M (Invitrogen)

La DNA polimerasi è ottenuta dal batterio *Thermophilus aquaticus*, un batterio termofilo, la cui polimerasi non si denatura alle temperature superiori a 94°C, raggiunte durante il ciclo di denaturazione-rinaturazione dell'amplificazione.

La Taq polimerasi usa DNA a singola elica come stampo per la sintesi dell'elica complementare.

Il ciclo di amplificazione è stato il seguente:

95 °C 5 minuti,
95 °C 1 minuto (denaturazione),
55 °C 2 minuti (appaiamento),
72 °C 2 minuti (allungamento),
72 °C 1 minuto e 30 secondi.

} 30 cicli

Le reazioni di amplificazione sono state condotte nel Termociclatore T1 della Biometra.

I prodotti di PCR sono stati separati elettroforeticamente su gel di agarosio 1.5% in TBE 0.5X e visualizzati con una soluzione di EtBr, rilevabile con una lampada ad UV.

3.2.4 Southern blotting

Le fragole transgeniche ottenute da Monticelli *et al.* (2002), sono state sottoposte a caratterizzazione molecolare, tramite l'ausilio della tecnica del Southern blotting, che permette di definirne la struttura genica e il numero di copie inseritesi nel corredo genetico della pianta (**Tab. 9**).

Digestione del DNA, separazione e trasferimento su membrana

Ogni campione di DNA è stato digerito, separatamente, con due coppie di enzimi di restrizione: EcoRI/ PstI e EcoRI/ HindIII scelti in maniera da tagliare all'esterno dei geni esogeni. La reazione è stata condotta a 37 °C per 12 ore, in 50 µl totali, contenenti 3 µg di DNA, soluzione tampone 10X, 4U di ogni enzima e 7 mM di spermidina.

I prodotti della digestione sono stati separati elettroforicamente su gel d'agarosio all'1% in TBE 0.5X per 12 ore, visualizzati tramite colorazione in bromuro d'etidio e fotografati sotto luce UV.

Dopo l'elettroforesi i gel sono stati sottoposti ad un trattamento consistente in:

- depurinazione in HCl 250 mM, 10' a temperatura ambiente (RT);
- risciacquo in acqua bidistillata;
- denaturazione in NaOH 0.5 M e NaCl 1.5 M, due sciacqui a RT da 15';
- risciacquo in acqua bidistillata;
- neutralizzazione in Tris-HCl 0.5 M e NaCl 1.5 M, due sciacqui a RT da 15';
- equilibratura in SSC 20X ((3 M NaCl, 0.3 M Na-citrato, pH 7,0), per 10'.

Il DNA digerito è stato trasferito su membrana, carica positivamente (Roche), mediante trasferimento verticale con SSC 20X per 16 ore; in seguito, esso è stato fissato sulla membrana in stufa, a 80°C per 2 h (**Fig. 9**).

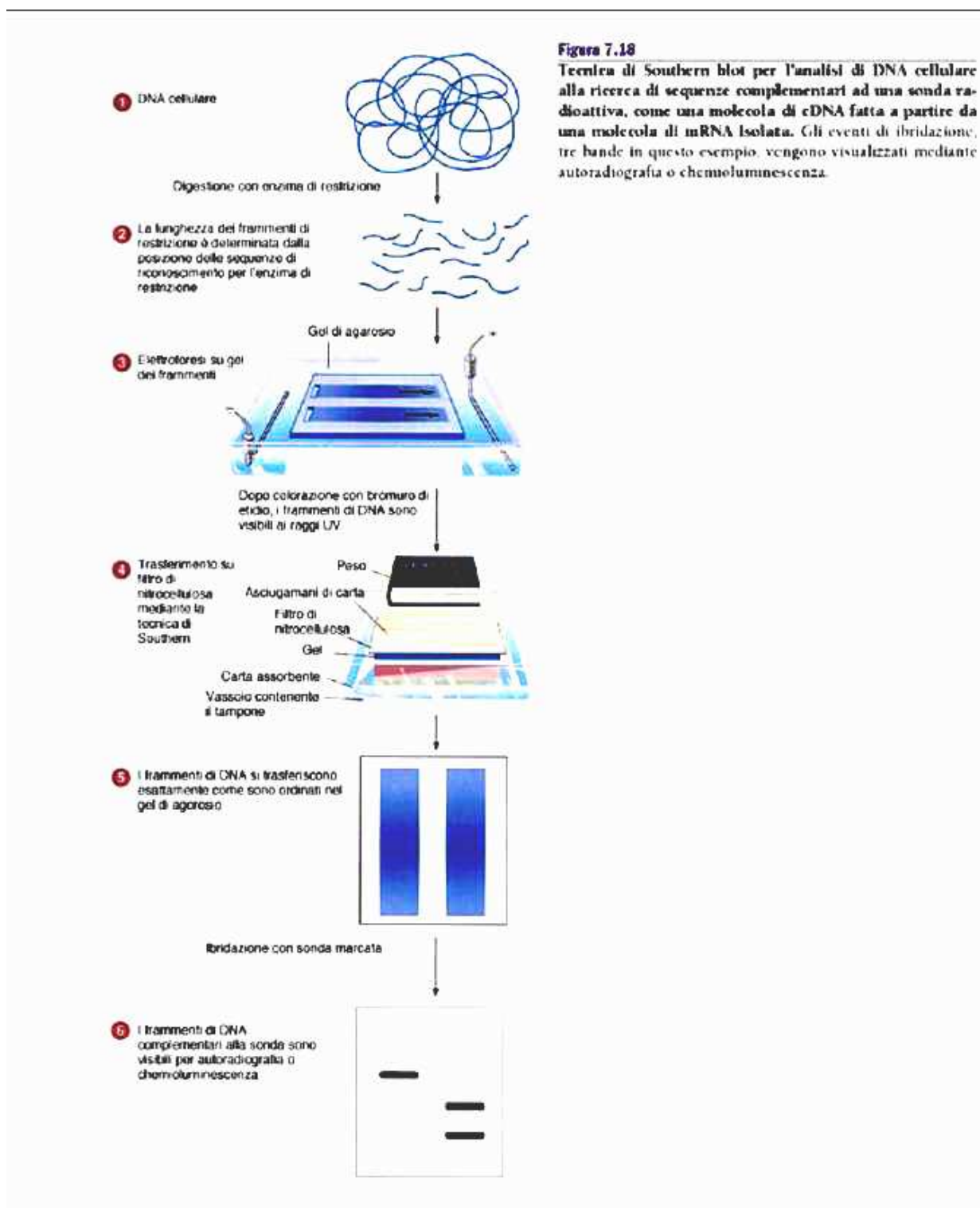


Fig. 9. Digestione del DNA, separazione, trasferimento su membrana e ibridazione.

Preparazione delle sonde

Le sonde utilizzate per i geni *nptII* e *uidA*, ottenute da reazione di PCR con primer specifici, sono state marcate con la digossigenina (**Fig. 10**), secondo il protocollo “Nonradioactive DNA Labeling and Detection Kit” (Boehringer Mannheim). Sono state fatte diverse prove di marcatura variando il rapporto Dig-dUTP:dTTP (1:3, 1:6, 1:10, 1:20).

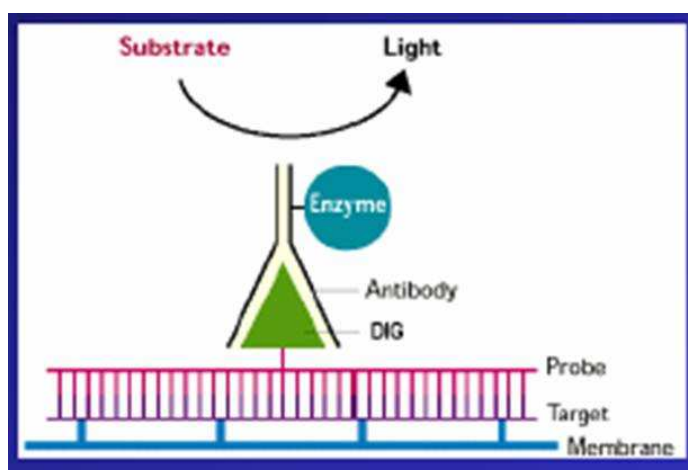
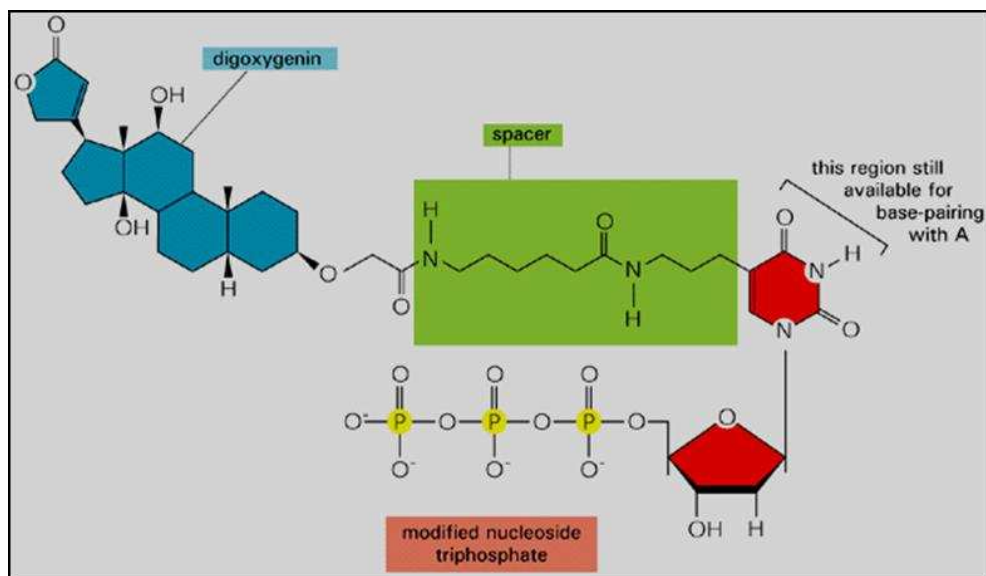


Fig. 10. Struttura chimica della digossigenina e marcatura immuno-istochimica delle sonde.

La reazione è stata condotta in un volume di 100 µl totali, contenente:

- 10 ng di DNA plasmidico,
- 1 mM di Tris-HCl (pH 9), 5 mM di KCl, 2,5 mM MgCl₂
- 2.6 U di Taq Expand High Fidelity PCR System (Roche),
- dNTP (A+G+C) 200 µM (Invitrogene)
- Dig-dUTP : dTTP (1:20) (Roche),
- 0,2 µM di ogni primer (Invitrogene).

I primer utilizzati sono stati rispettivamente:

per ***nptII*** a **428 pb**,

- 5'-GAC TGG GCA CAA CAG ACA ATC (forward);
- 5'-AGC CCC TGA TGC TCT TCG TC (revers);

per ***nptII*** a **700 pb**

- 5'-GAC TGG GCA CAA CAG ACA ATC (forward);
- 5'-ATC GGG AGC GGC GAT ACC GTA (riverse);

per ***uidA*** a **527 pb**

- 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG (forward);
- 5'-GGC AGA CTA TCC CGC CGG GA (revers);

per ***uidA*** a **1389 pb**

- 5'-GGT GGG AAA GCG CGT TAC AAG (forward);
- 5'-TGGCGGAAGCAACGCGTAAAC (revers);

Il ciclo di amplificazione, per tutte le sonde, è stato il seguente:

95 °C 5 minuti,

95 °C 1 minuto (denaturazione),	} 35 cicli
55 °C 2 minuti (appaiamento),	
72 °C 2 minuti (allungamento),	

72 °C 7 minuti

I prodotti di PCR sono, poi, stati analizzati elettroforicamente su gel d'agarosio all'1% in TBE 0.5X, colorati in EtBr e quantificati mediante confronto con marcatori a concentrazione nota.

Preibridazione, ibridazione e rilevamento del segnale

Per ogni ibridazione si è utilizzata una quantità di sonda di 2µg. Le membrane sono state ibridate secondo il metodo della chemiluminescenza (Nonradioactive DNA labeling and detection kit. Boehringer Mannheim), con alcune modificazioni:

- pre-ibridazione (5X SSC, 1% Blocking Reagent, 0.1% N-lauroylsarcosine, 0.02% SDS) a 42°C per 4 h 30';
- ibridazione a 42°C, per 16 h.;

Dopo l'ibridazione le membrane sono state lavate con concentrazioni decrescenti di SSC: rispettivamente 2X e 0.1X in 0.1% di SDS, a 68°C.

Ogni membrana è stata ibridata separatamente con tutte le sonde marcate, previa rimozione della sonda con due lavaggi a 37°C con 0.2 M NaCl, 0.1% SDS di 15' ognuno.

Di seguito sono elencati i passaggi successivi:

- Lavaggi in Washing Buffer (0.1 M Acido Maleico, 0.15 M NaCl; pH 7.5) per 2', cui va aggiunto Tween 20 allo 0.3 %
- Incubare in Blocking Solution (diluire 1:10 il Blocking stock 10X con Acido Maleico Buffer 1X,), per 3 ore a RT, in agitazione
- Incubare con l'anticorpo Anti-Digossigenina-AP, diluita 1:10000 in Blocking Solution per 30'
- 2 lavaggi da 15' a RT con Washing Buffer
- Equilibrare con Detection Buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) 3'
- Incubare con CDP-Star diluito 1:100 con Detection Buffer, per 5' a RT
- Posizionare la membrana nella pellicola (Saran)
- Esporre su lastre fotografiche per 25' (Lumi-film Chemiluminescent Detection Film della Roche).

3.3 Trasformazione

3.3.1 Materiale vegetale

Tre cultivar di fragola *Fragaria x ananassa*, Egla, Belora e Selva, messe a disposizione dal CRA-Centro di Ricerca per la Frutticoltura di Roma, sono state utilizzate per le prove di trasformazione, previa micropropagazione secondo il protocollo riportato precedentemente (vedi paragrafo 3.1.2).

3.3.2 Ceppi batterici

I ceppi batterici di *A. tumefaciens* utilizzati nelle prove di trasformazione sono stati forniti dall'Istituto di Biologia e Biotecnologie Agrarie del CNR di Roma.

Essi erano costituiti da:

- ceppo GV3101 e ceppo C58C1 entrambi contenenti il plasmide pCAMBIA 1302 con il gene codificante per la proteina GFP,
- ceppo LBA4404 contenente il plasmide pCAMBIA 1302 con il gene codificante per la proteina PGIP

In **Fig. 11** è riportata la mappa generale del plasmide pCAMBIA.

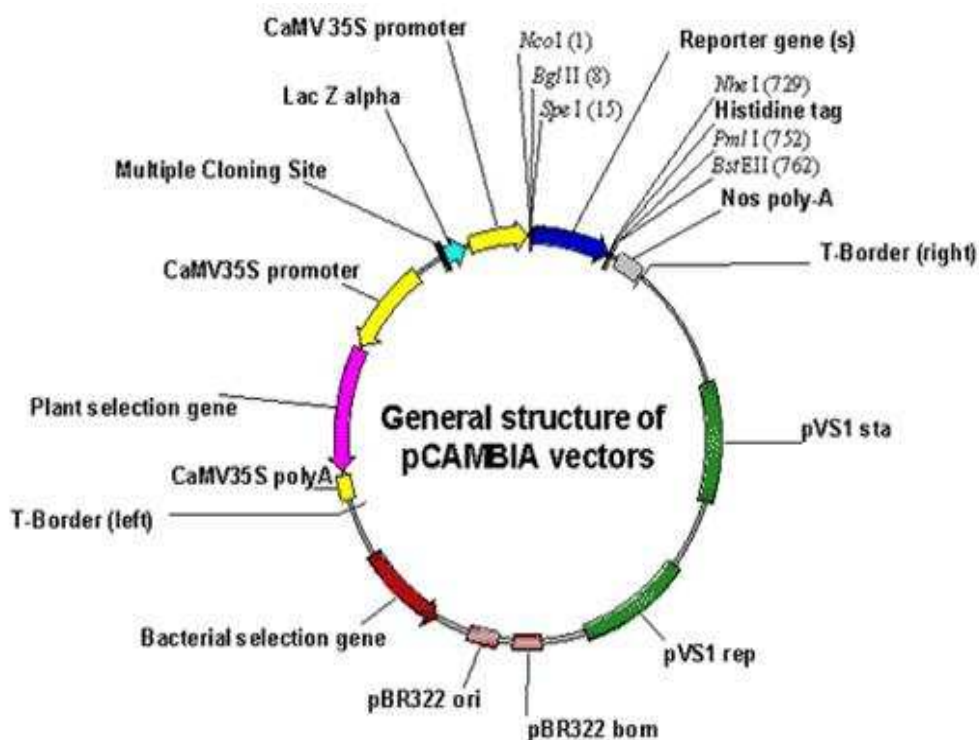


Fig. 11. Mappa generale del plasmide pCAMBIA

3.3.3 Terreno di coltura per batteri

- ❖ Luria Bertani broth (LB), 10 gL⁻¹ di peptone, 5 gL⁻¹ di NaCl, 5 gL⁻¹ di estratto di lievito, pH 7.5 (Luria S. E. *et al.*, 1957)

3.3.4 Infezione mediante *Agrobacterium tumefaciens*

I batteri sono stati messi a crescere in LB con 50 mgL⁻¹ di kanamicina per selezionare solo i batteri resistenti, 0,4 mgL⁻¹ di acetosiringone per aumentarne la virulenza e 4 mgL⁻¹ di prolina per favorirne la proliferazione. Essi sono stati fatti crescere a 28°C in agitazione per tutta la notte fino ad una densità ottica di 0,6 a 600 nm. Dopodiché, sono stati centrifugati 20 minuti a 6000 rpm e rimessi a crescere in LB senza antibiotico, alle condizioni prima menzionate. A questo punto, sono stati prelevati espianti di stipole e foglie dalle varie cultivar, prodotto delle ferite con il bisturi e messe in immersione nella soluzione di infezione in leggera agitazione a 24°C per 20 minuti.

Una parte del campione non è stata infettata, come controllo negativo.

3.3.5 Rigenerazione e selezione dei rigeneranti transgenici

Gli espianti, poi, sono stati asciugati su carta bibula sterile e adagiati sul terreno di rigenerazione (MS, vitamine MS, 1 mgL⁻¹ BAP, 3% di saccarosio 0,55% di agar, pH 5.6) e messi al buio in co-coltura, le stipole per due giorni e le foglie per due settimane.

In seguito, gli espianti sono stati sciacquati in acqua sterile con cefotaxime 500 mgL⁻¹, asciugati su carta sterile e rimessi su terreno di rigenerazione MS-R con cefotaxime 500 mgL⁻¹, alla luce. Le subcolture sono state effettuate ogni due settimane.

Dopo un mese dalla prima coltura tutti gli espianti sono stati sottoposti a selezione su terreno MS con antibiotico: i ceppi GV3101 e C58C1 sono stati posti su igromicina 10 mgL⁻¹, mentre il ceppo LBA4404 su kanamicina 50 mgL⁻¹.

IV

RISULTATI

4.1 Incroci

4.1.1 Vitalità e germinabilità del polline

Il polline raccolto in antesi dalle fragole transgeniche, derivanti dalle rigenerazioni della cultivar Teodora (*F. x ananassa*, Duch., 8n), ha mostrato una vitalità pari all'85% (Fig. 12).

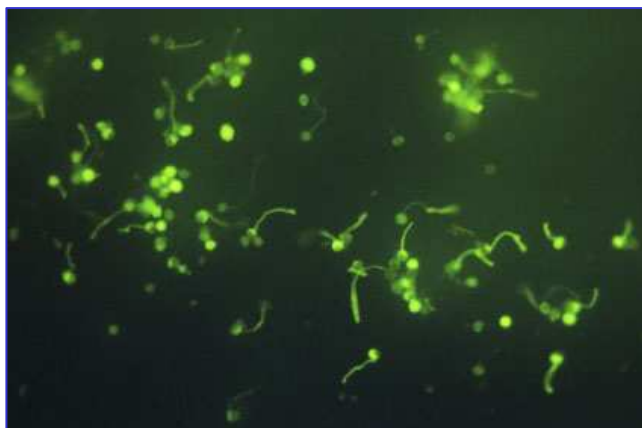


Fig. 12. Polline transgenico in fluorescenza.

Tab. 11. Percentuali vitalità del polline.

Pianta donatrice	Epoca di raccolta	% vitalità
10	del 09.03.06	20%
10	del 16.03.06	95%
10	del 24.03.06	95%
10	del 26.03.06	95%

Inoltre, la sua germinabilità valutata come descritto precedentemente (par. 3.1.3) è stata testata osservando lo sviluppo di tubetti pollinici al microscopio ottico (**Fig. 13**). La conta ha rilevato un numero minimo di circa 400 granuli pollinici germinabili.

Di seguito sono elencate le percentuali di germinabilità durante il periodo delle impollinazioni (**Tab. 12**):

Tab. 12. *Percentuali di germinabilità del polline.*

Pianta donatrice	Epoca di raccolta	% germinabilità
10	del 09.03.06	0.7 %
10	del 16.03.06	50 %
10	del 18.03.06	52.3 %
10	del 23.03.06	50 %
10	del 24.03.06	55.7 %
10	del 26.03.06	50 %
10	del 29.03.06	51.2 %
10	del 05.04.06	4.3 %



Fig. 13. *Polline transgenico al microscopio ottico*

Le impollinazioni sono state effettuate nell'arco di sei settimane. Durante questo periodo, si è osservato un decadimento progressivo della vitalità e della germinabilità del polline. Gli incroci sono stati realizzati con polline avente una percentuale di germinabilità $\geq$ al 50%.

4.1.2 Germinazione dei semi

In tabella 13 sono riportati i risultati della germinazione dei semi, previa vernalizzazione e sterilizzazione (**Tab. 13, Fig. 14**):

Tab. 13. Germinazione semi di fragola in vitro.

Incroci (polline clone '10')	Ploidia	N. semi sterilizzati	% germinazione
Pianta donatrice clone '10' (autofecondazione)	8n	98	17.4
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8n	14	64.3
<i>F. virginiana</i>	8n	65	24.6
<i>F. moschata</i> , 'Capron Royal'	6n	320	41.3
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	2n	214	88,8
<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	2n	114	25.4
<i>F. vesca</i> 'Snovit'	2n	71	16.9
<i>F. chiloensis</i>	8n	-	-

Come si può facilmente osservare, i più alti tassi di germinazione sono stati ottenuti da *F. vesca* "Zimbaro", con il 88,8 % dei semi sottoposti a trattamento, mentre quello più basso è stato registrato da *F. vesca* "Snovit", con il 16,9 % . Dalla *F. chiloensis* non è stato possibile raccogliere frutti.

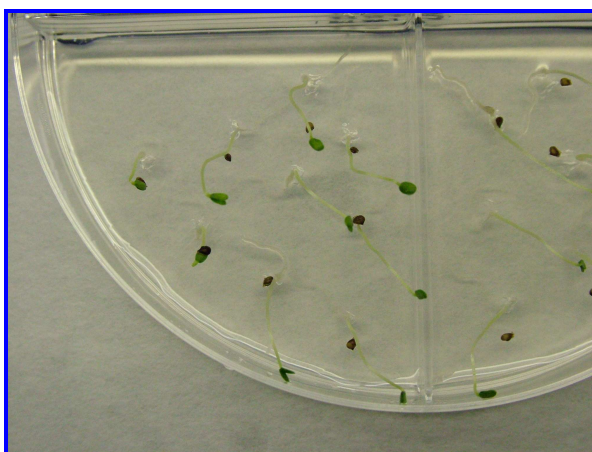


Fig. 14. Acheni su terreno di germinazione.

4.1.3 Espressione GUS in semi e in foglie

Qui di seguito vengono riportati i risultati ottenuti dai saggi GUS condotti sui semi (Tab. 14a) e sulle foglioline (Tab. 14b), provenienti dagli incroci tra piante di fragola transgeniche con diversi genotipi di fragole (Tab. 14a, b; Fig. 15a, b, c).

Tab. 14a. Saggio GUS su semi.

Genotipo	Ploidia	N. semi saggiati	Semi GUS +	%
Pianta donatrice clone '10' (autofecondazione)	8n	362	176	48.6
<i>F. virginiana</i>	8n	86	51	59.3
<i>F. moschata</i> 'Capron Royal'	6n	52	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	2n	45	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	2n	128	14	10.9
<i>F. vesca</i> 'Snovit'	2n	74	6	8.1
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8n	21	8	38.1
<i>F. chiloensis</i>	8n	-	-	-

Tab. 14b. Saggio GUS su foglie.

Genotipo	Ploidia	N. piante saggiate	Piante GUS +	%
Pianta donatrice clone '10' (autofecondazione)	8n	20	20	100
<i>F. virginiana</i>	8n	16	8	50
<i>F. moschata</i> 'Capron Royal'	6n	133	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	2n	211	1	0.5
<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	2n	24	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Snovit'	2n	12	0	0.0
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8n	8	2	25
<i>F. chiloensis</i>	8n	-	-	-

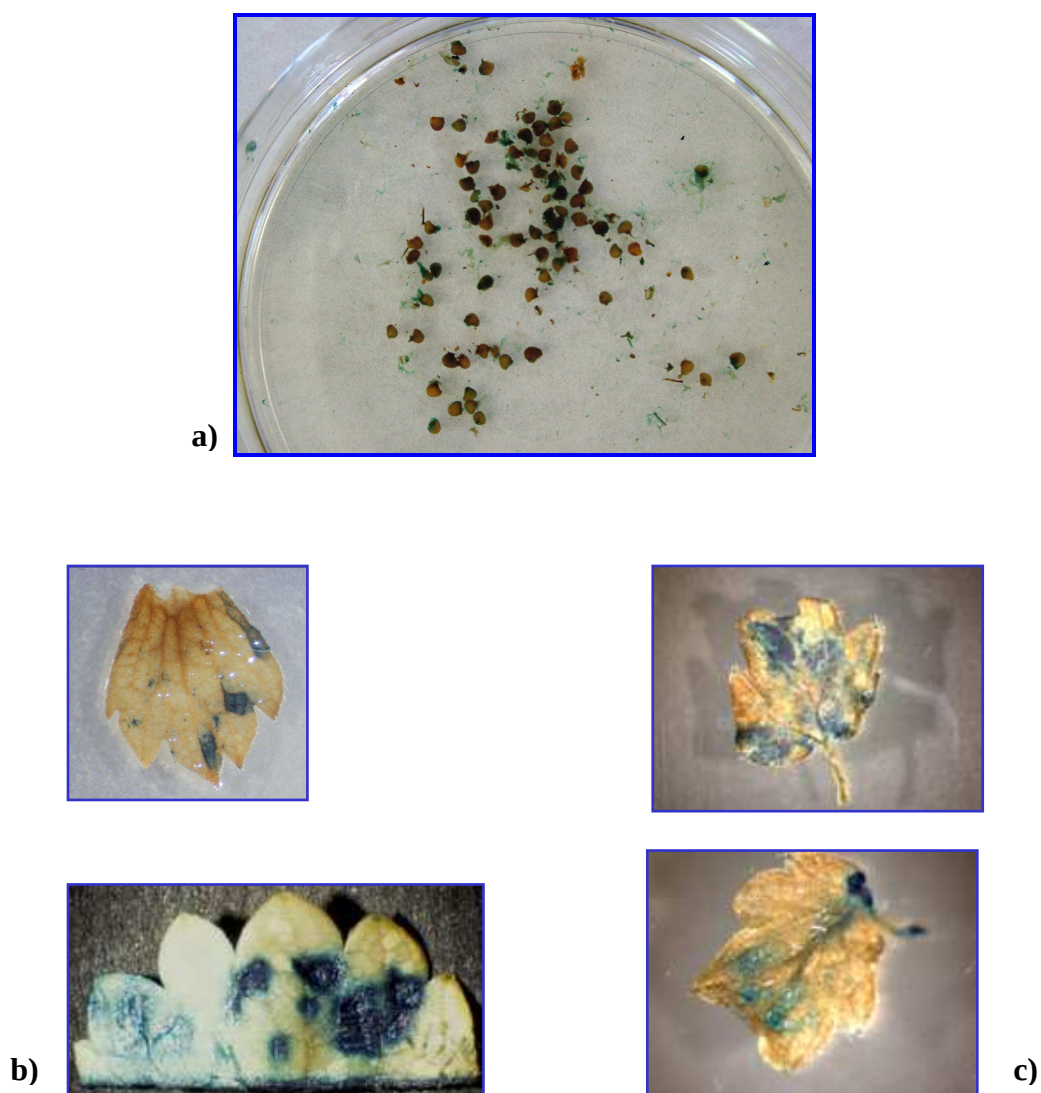


Fig. 15. Saggio GUS su semi provenienti dagli incroci (a), su foglie delle piante transgeniche (b) e degli incroci (c).

Nell'autofecondazione del clone 10 (transgenico), l'analisi dell'espressione GUS è risultata positiva nel 100% dei semi germinati, mentre quando gli acheni stessi venivano sottoposti direttamente al saggio GUS, questo era positivo solo nel 48.6 % dei campioni.

Per gli incroci tra polline transgenico e pianta portaseme non trasgenica, la risposta dell'analisi istochimica (GUS) variava in relazione al tipo di incrocio: nel caso di *F. virginiana* il saggio GUS è positivo nel 59.3% dei semi non germinati e nel 50% di quelli germinati; per la *F. moschata* cv Capron Royal l'analisi dell'espressione GUS è stata negativa sia per i semi non germinati che per quelli germinati. Nel caso dell'incrocio con *F. vesca* i risultati sembrano discordanti all'interno delle tre cultivar prese in esame. Infatti nella cv Zimbaro si otteneva una risposta GUS-negativa per tutti i semi non germinati e solo in un caso (0.5%) si aveva una pianta GUS-positiva per i semi germinati. Le varietà

Ilaria e Snovit presentavano entrambe risposta GUS-negativa nei semi germinati, mentre davano risposta GUS-positiva in quelli non germinati, rispettivamente pari al 10.9 % e al 8.1%. Infine, per la cultivar Capitola di *F. x ananassa* solo il 38,1% dei semi è risultato GUS-positivo, contro un 25% dei semi germinati.

4.1.4 Selezione con kanamicina della progenie derivante da incrocio

Le piante ottenute da incrocio con polline proveniente da cloni transgenici della cv Teodora sono state saggiate su terreno selettivo, contenente kanamicina 50 mg/l. I risultati ottenuti, riportati in **tabella 15**, hanno confermato quelli dell'indagine istochimica dell'espressione GUS. In un caso dell'incrocio tra il clone transgenico '10' con 'Zimbaro' si è verificata clorosi fogliare, nonostante in precedenza abbia dato risposta positiva al saggio GUS.

Tab. 15. Selezione su kanamicina.

Genotipo	Piante in selezione	Piante resistenti	%
Pianta donatrice clone '10' (autofecondazione)	20	20	100
<i>F. virginiana</i>	16	8	50
<i>F. moschata</i> 'Capron Royal'	133	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	211	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	24	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Snovit'	12	0	0.0
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8	2	25
<i>F. chiloensis</i>	-	-	-

4.2 Analisi molecolare

4.2.1 Analisi molecolare in PCR

In **tabella 15** sono riportati i risultati sulla valutazione della presenza dei geni *uidA* e *nptII*, effettuata con tecnica PCR, così come descritto nel par. 2.2.4. Come era lecito attendersi, nell'autofecondazione tutte le piante ottenute dalla germinazione dei semi sono risultate positive alla PCR, sia per il gene *uidA* che per il gene *nptII*. Nel caso dei semi derivanti da incrocio tra polline transgenico e pianta portaseme non transgenica, le percentuali di semi contenenti i trasgenici variano: si passa dal 50% dell'incrocio con *F. virginiana* al 25% dell'incrocio con *F. x ananassa* cultivar Capitola, mentre non sono stati individuati semi contenenti i trasgeni per quanto riguarda gli incroci con la *F. moschata* cv Capron Royal (6n) e le cv Zimbaro e Snovit di *F. vesca* (2n).

Tab. 16. PCR *gusA* e *nptII*.

Genotipo	Ploidia	N. piante saggiate	PCR <i>uidA</i> +	PCR <i>nptII</i> +	%
Pianta donatrice clone '10' (autofecondazione)	8n	20	20	20	100
<i>F. virginiana</i>	8n	16	8	8	50
<i>F. moschata</i> 'Capron Royal'	6n	133	0	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Zimbaro'	2n	211	1	1	0.8
<i>F. vesca</i> 'Ilaria'	2n	24	0	0	0.0
<i>F. vesca</i> 'Snovit'	2n	12	0	0	0.0
<i>F. x ananassa</i> 'Capitola'	8n	8	2	2	25

Le figg. 5a e 5b mostrano esempi di amplificazione in PCR rispettivamente per i geni *nptII* e *uidA*.

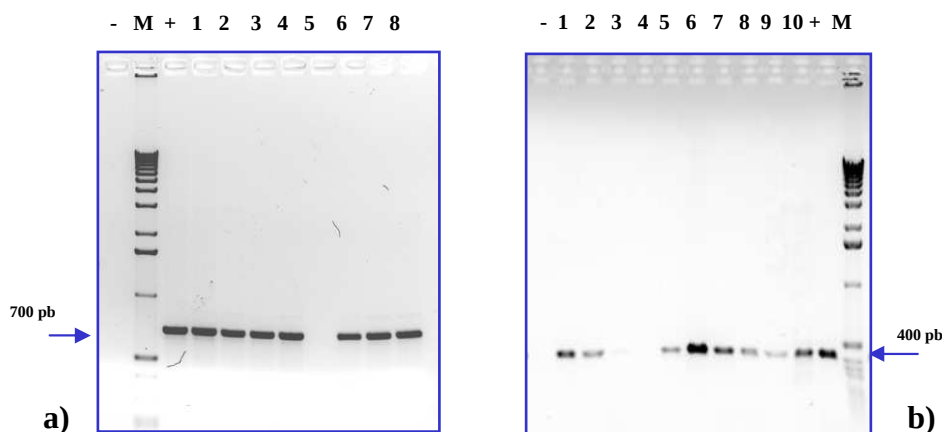


Fig. 16. Amplificazione in PCR dei geni *nptII* (a) e *uidA* (b). -/+ controllo negativo/positivo, M marker, 1-2-3-4-5-6-7-8 incroci F1.

4.2.2 Southern blotting

Dalla digestione del DNA genomico estratto dalle foglie delle piante transgeniche donatrici di polline, si sono ottenuti i seguenti risultati (**Fig. 17a, b**):

1. Per quanto riguarda le membrane ibridate con la sonda *uidA* e la coppia di enzimi EcoRI-HindIII si è ottenuta una banda a circa 8576 pb e una a circa 2799 pb (I, III), mentre con quella per *nptII* si è ricavata una banda a circa 3000 pb e una a circa 5000 pb (II, IV).

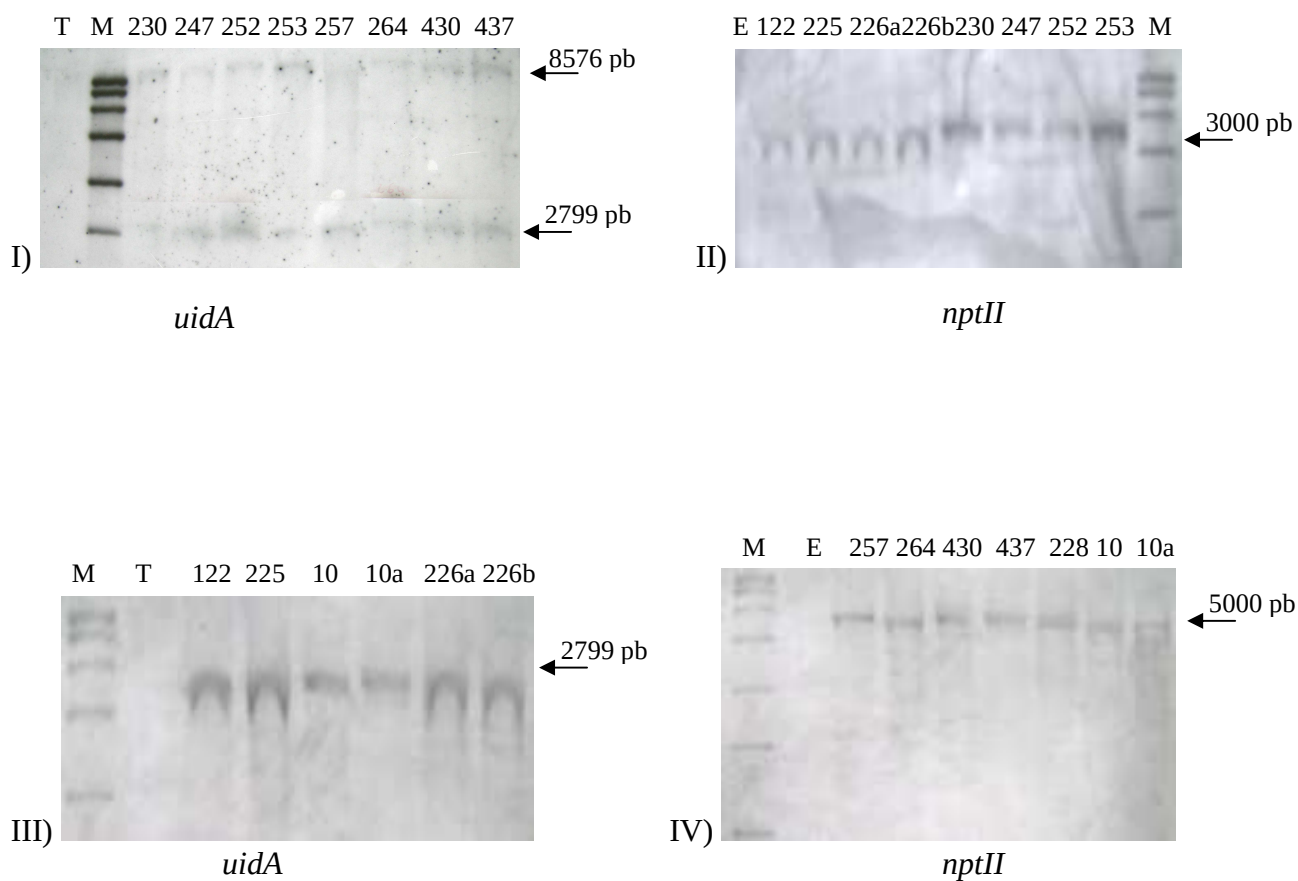


Fig. 17a. Ibridazioni con le sonde per *uidA* e *nptII*. M marker DNA VII Dig-labeled, T/E Teodora ed Egla non trasformate.

2. Per l'altra coppia di enzimi, EcoRI-PstI, si è ottenuta una banda a circa 8576 pb e un'altra a 2799 pb con la sonda per *uidA* (V, VII), mentre per *nptII* si sono ottenute quattro bande (8600, 8576, 4899, 2799 pb) per i campioni derivanti da rigenerazioni della 10 e due bande (6106, 3639 pb) per i campioni derivanti dalle rigenerazioni della 122 (VI, VIII). Tutte le sonde hanno fornito risultati specifici, tranne la sonda *gusA* a 1200 pb.

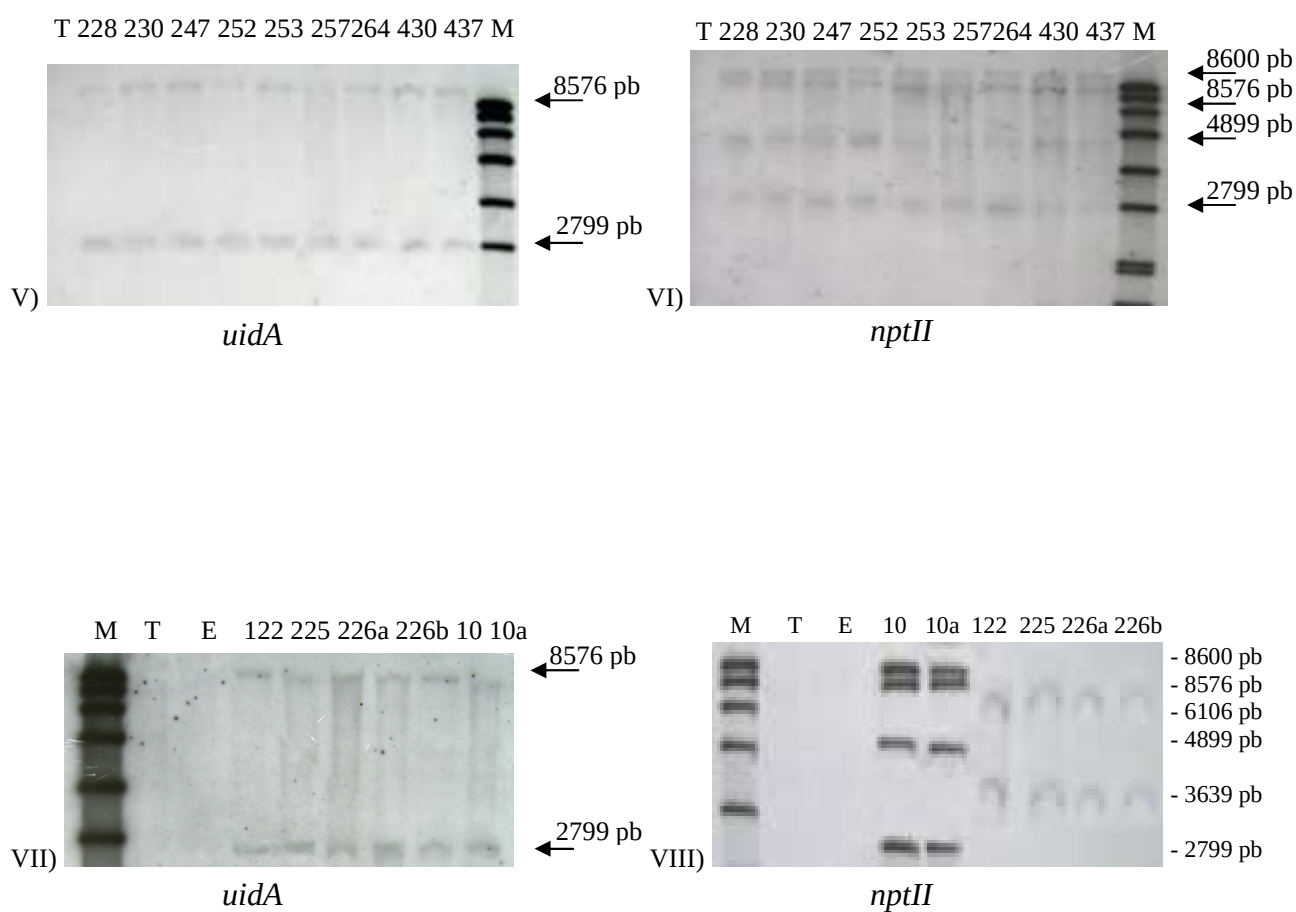


Fig. 17b. Ibridazioni con le sonde per *uidA* e *nptII*. M marker DNA VII Dig-labeled, T/E Teodora ed Eglia non trasformate.

4.3 Trasformazione

Per quel che riguarda le infezioni e le rigenerazioni dalle stipole e dalle foglie delle tre cultivar di fragola (Belora, Selva ed Egla), i risultati sono riportati nelle tabelle e nelle figure seguenti (**Tab. 17 a, b; Figg. 18 a,b,c e 19 a, b,c**):

Tab. 17a. *Infezioni e rigenerazioni da stipole.*

CULTIVAR	CEPPO	N° STIPOLE	N° RIGENERAZIONI	% RIGENERAZIONI
Belora	A	228	36	15.8
	B	90	20	22.2
	C	163	23	14.1
Selva	A	87	10	11.5
	B	154	26	16.9
	C	41	8	19.5
Egla	A	111	32	28.8
	B	84	23	27.4
	C	72	22	30.6

Tab. 17b. *Infezioni e rigenerazioni da foglie.*

CULTIVAR	CEPPO	N° FOGLIE	N° RIGENERAZIONI	% RIGENERAZIONI
Belora	A	194	0	0
	B	117	0	0
	C	193	0	0
Selva	A	120	0	0
	B	158	0	0
	C	84	0	0
Egla	A	72	0	0
	B	123	0	0
	C	93	0	0

A) LBA4404 pCAMBIA 1302-PGIP

B) GV3101 pCAMBIA 1302-GFP

C) C58C1 pCAMBIA 1302-GFP

Per quanto riguarda gli esperimenti di trasformazione su espianti di stipole, si sono raggiunti discreti risultati nella cultivar “Egla”, con il 30.6 % di rigenerazioni, utilizzando il ceppo batterico C58C1 pCAMBIA 1302-GFP. Nella cultivar “Selva” la percentuale di rigenerazione più elevata è stata del 19.5 %, sempre con il ceppo C58C1 pCAMBIA 1302-

GFP, mentre nella cultivar “Belora” si è raggiunto il risultato più alto con il 22.2 % di rigenerazioni utilizzando il ceppo batterico GV3101 pCAMBIA 1302-GFP.

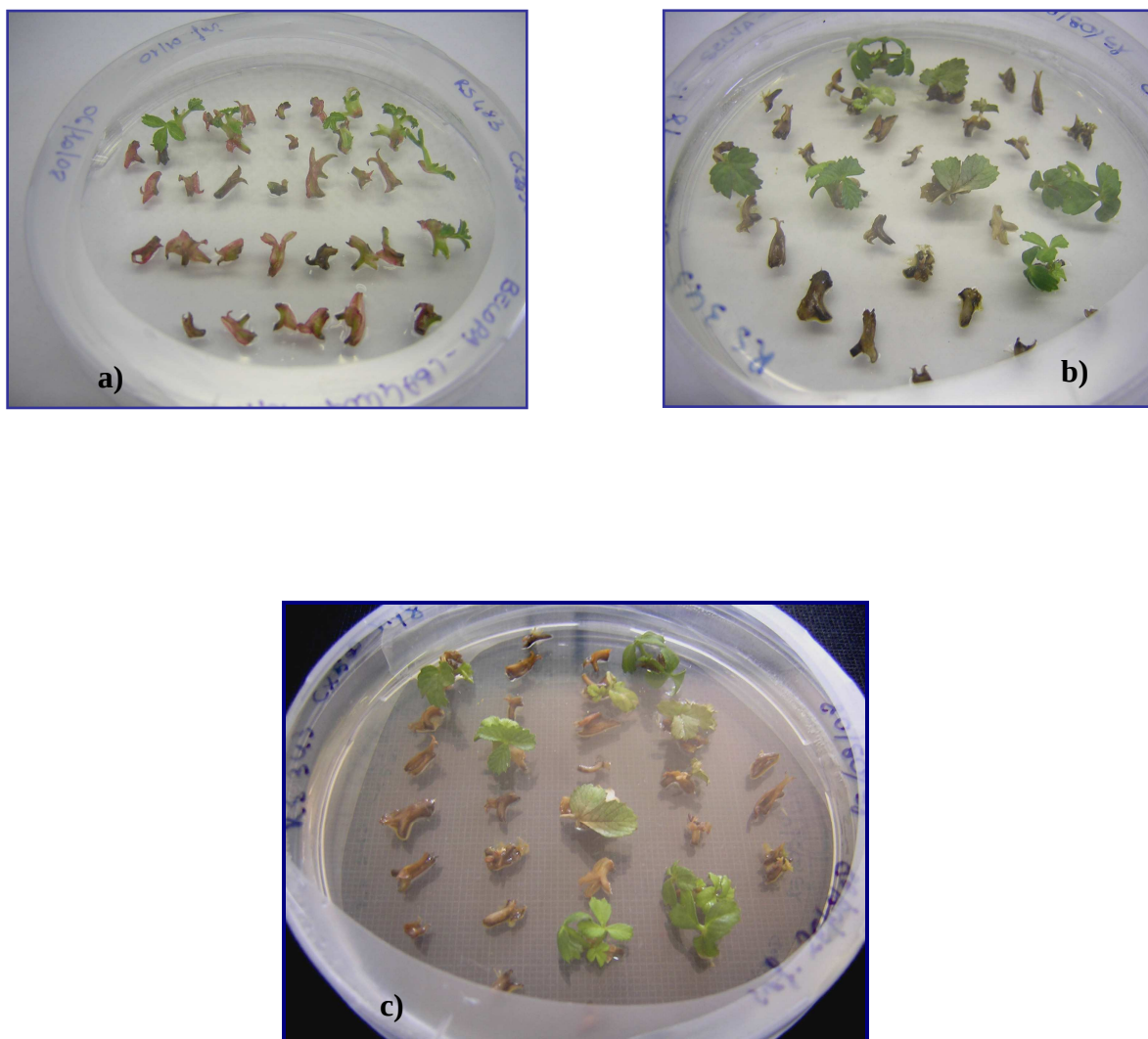


Fig. 18. Rigenerazioni da stipole infettate con *Agrobacterium tumefaciens*:
a) Belora LBA4404 pCAMBIA 1302 PGIP, b) Selva GV3101 pCAMBIA 1302 GFP,
c) Egla C58C1 pCAMBIA 1302-GFP.

Nel caso delle infezioni su espianti di foglia, purtroppo, non si sono ottenute rigenerazioni, nonostante l'impiego di diversi protocolli individuati in letteratura. Con il passare dei giorni, le foglie andavano incontro a necrosi progressiva e irreversibile (**Fig. 19 a,b,c**).

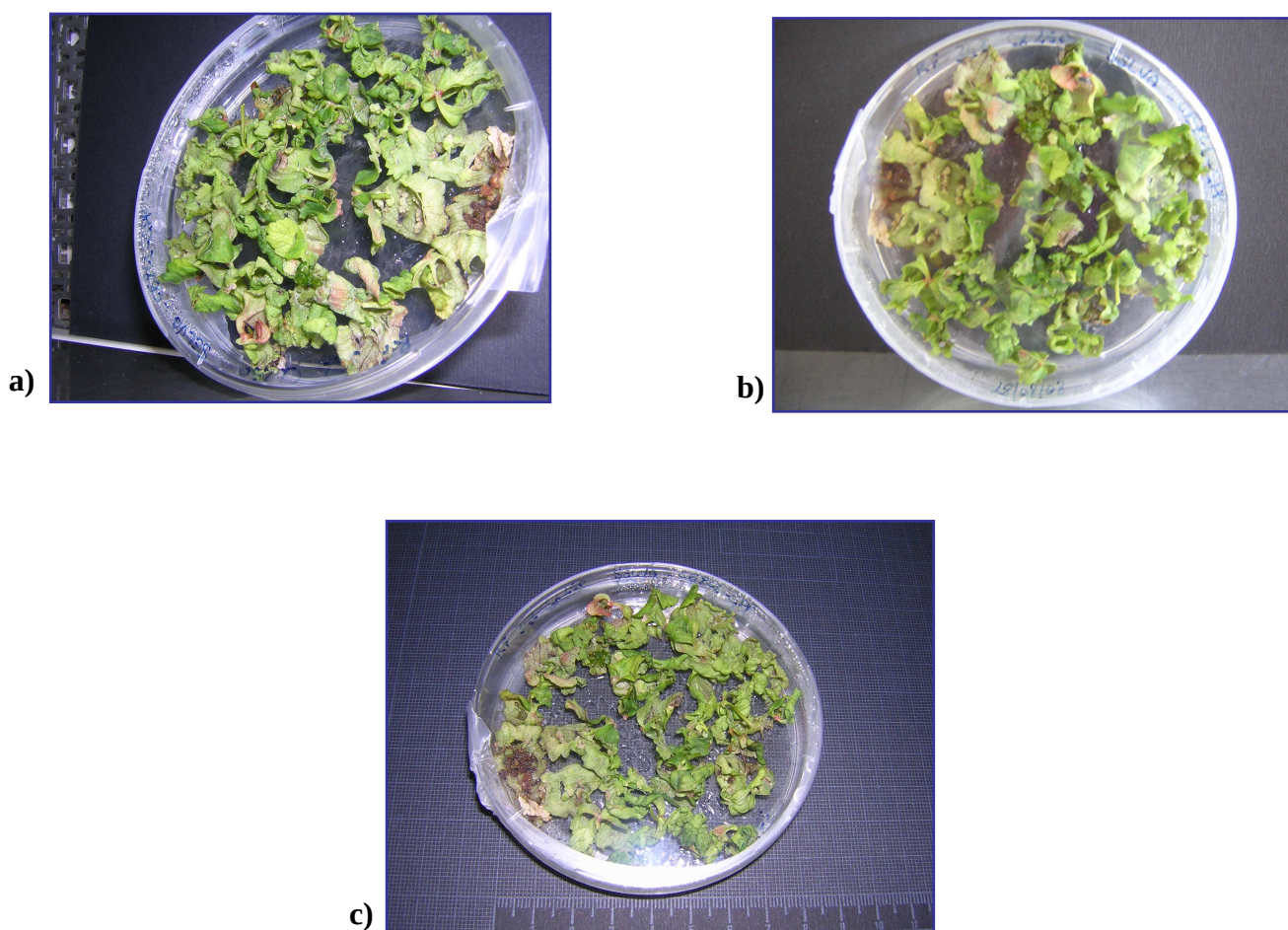


Fig. 19. Rigenerazioni da stipole infettate con *Agrobacterium tumefaciens*:
a) Belora LBA4404 pCAMBIA 1302 PGIP, b) Selva GV3101 pCAMBIA 1302 GFP,
c) Egla C58C1 pCAMBIA 1302-GFP.

Dopo un mese dalle infezioni gli espianti rigeneranti sono stati sottoposti a pressione selettiva su antibiotico, ma nessun trasformatante è stato, ad oggi, individuato (**Fig. 20 a,b**).

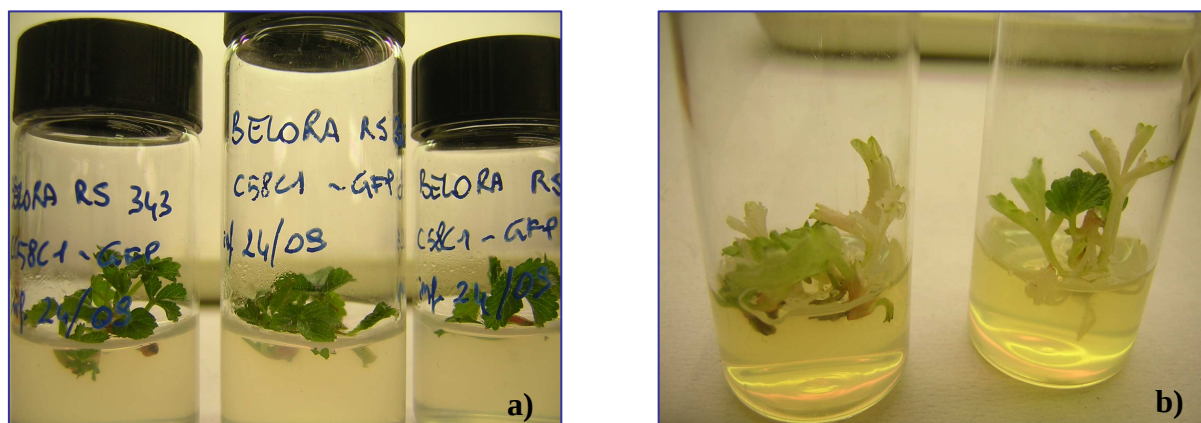


Fig. 20. Selezione degli incroci su kanamicina **(a)**; dopo un mese dall'inizio della selezione **(b)**.

V

DISCUSSIONE

L'incorporazione di geni appartenenti a una o più popolazioni in un'altra popolazione è alla base del Flusso Genetico (FG). L'analisi delle conseguenze del FG da popolazioni di piante coltivate a piante selvatiche con esse compatibili o da piante coltivate ad altre piante coltivate ha assunto nuovo interesse con l'introduzione nella pratica agricola delle Piante Geneticamente Modificate (PGM). Inoltre, esso potrebbe avere delle conseguenze importanti per invasività e persistenza nell'ambiente delle PGM. Per questo si rende necessario un'ulteriore indagine sul rischio di dispersione dei geni, determinando i fattori che influenzano l'estensione del flusso genico, come la stabilità d'espressione del transgene di generazione in generazione o la distribuzione geografica degli Organismi Geneticamente Modificati e le specie selvatiche.

Lo sviluppo di strategie di miglioramento genetico non convenzionale quale l'ingegneria genetica ha trovato, negli ultimi anni, applicazione sia nella fragola coltivata *F. x ananassa* (Duch.) che nella fragolina di bosco *F. vesca* (L.) (James *et al.*, 1990; Haymes and Davis, 1998).

La trasmissione dei caratteri transgenici è stata analizzata in differenti specie quali arachide (Cheng *et al.*, 1997), canna da zucchero (Butterfield *et al.*, 2002), frumento (Rooke *et al.*, 2003), mais (Miller *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005) con lo scopo di studiarne sia l'ereditarietà sia il tipo di segregazione nella progenie. Infatti, lo sviluppo e il successo del miglioramento genetico attraverso l'ingegneria genetica dipende tanto dalla stabilità quanto dalla possibilità di poter prevedere l'espressione del gene inserito (Demeke *et al.*, 1999).

La principale via di trasmissione genica dalle piante agrarie alle specie selvatiche correlate è rappresentata dal polline (Kareiva *et al.*, 1991; Ellstrand, 1992). La percentuale del flusso genico da polline può essere influenzata da fattori ecologici e genetici. Per esempio, l'alta percentuale di incrocio e la bio-impollinazione possono incrementare la probabilità di flusso genico (Fryxell, 1957). Inoltre, molte piante, tra cui la fragola, producono frutti eduli appariscenti che vengono dispersi dagli animali anche a lunghe

distanze (Westman *et al.*, 2001). In confronto al flusso genico tramite il polline, i meccanismi di dispersione dei semi potrebbero, quindi, rappresentare un rischio maggiore (Ellstrand and Hoffman, 1990).

La fragola coltivata, specie a propagazione vegetativa che oltretutto si incrocia facilmente, si presta allo studio della trasmissione di transgeni e all'analisi del rischio di flusso genico nell'ambiente. Questo rischio è considerato alto in specie che, proprio come la fragola, presentano progenitori selvatici e hanno mostrato la possibilità di flusso genico tra specie coltivate (*Fragaria x ananassa*) e specie affini come *F. virginiana*. Uno studio condotto attraverso marcatori di tipo AFLP ha rilevato la presenza di marcatori molecolari caratteristici di *Fragaria x ananassa* in una popolazione spontanea di *F. virginiana*, che si trovava a 100 m da essa, fino ad una distanza massima di 7.5 km (Westman *et al.*, 2001). Quindi lo scambio genico interspecifico in *Fragaria* è possibile e rende questo genere un interessante modello di studio tra le specie fruttifere perenni. In *Fragaria spp* diverse evidenze sperimentali dimostravano che era possibile uno scambio genico: in *F. x ananassa* (James *et al.*, 1990; Monticelli and Damiano, 2002) ed in *F. vesca* (Haymes and Davis, 1998); i transgeni possono essere trasferiti per autofecondazione dalla generazione R0 alla R1.

In questo lavoro si sono portati avanti esperimenti d'incrocio intra- ed interspecifici con polline prodotto da piante transgeniche di fragola, mantenute in una serra di contenimento. Inoltre, si è scelto di praticare impollinazioni manuali ed emasculazione dei fiori riceventi, così da impedire l'autofecondazione.

Scopo del lavoro era anche stabilire la trasmissibilità dei trasgene alla progenie derivante da polline transgenico a differenti specie del genere *Fragaria*, così da formulare ipotesi sulla possibilità di scambio genico attraverso il polline transgenico all'interno del genere.

Dai test di vitalità e germinabilità condotti su polline transgenico, si è osservata una percentuale di vitalità media del 76.3%, mentre per la germinabilità la percentuale media è stata del 39.3%. Esse andavano scemando durante le sei settimane in cui sono state effettuate le impollinazioni.

I risultati ottenuti sia dall'esame PCR (Tab. 16) che dal saggio GUS su foglie (Tab. 14b) e su semi non germinati (Tab. 14a), mostrano che nel caso dell'autofecondazione (clone 10 transgenico della cv Teodora) si sono ottenute piante portatrici dei transgeni *nptII:uidA*. In particolare, la presenza dei geni esogeni è in un rapporto di circa 2:1 tra semi germinati (100% di GUS positivi) e semi non germinati (48.6 % di GUS positivi).

Per gli incroci tra clone 10 della cv Teodora e *F. moschata*, i semi raccolti analizzati sia come semi non germinati che come piante ottenute dalla germinazione dei semi (133), hanno confermato che non c'è stato scambio di materiale genetico tra i due genotipi oggetto dell'incrocio. Inoltre, vista la numerosità del campione analizzato (52 semi non germinati e 133 germinati, analizzati come piantine), paragonabile in valore assoluto a quella analizzato in altri incroci di questo studio (vedi Materiali e Metodi), si può ritenere che il campione analizzato era comunque sufficiente per lo studio della trasmissione dei transgeni in questo incrocio. In questi casi, vista la diversa ploidia che intercorre tra di esse, potrebbero essersi verificate dele anomalie nel momento della segregazione dei cromosomi omologhi durante la meiosi che escluderebbe a priori un appaiamento con il cromosoma contenente il transgene.

Nel caso dell'incrocio dove era coinvolta la *F. chiloensis*, non si sono ottenuti semi dall'impollinazione. Da questo incrocio, essendo la specie una dei progenitori delle fragole coltivate, tra cui anche il clone transgenico 10 della cv Teodora (*Fragaria x ananassa*), ci si aspettava un certo numero di piante portanti i caratteri transgenici. Molto probabilmente però, il basso numero di fiori impollinati (8 fiori) non hanno consentito di raccogliere semi. Comunque, questo risultato andrebbe ulteriormente indagato anche alla luce dei dati ottenuti nell'incrocio tra polline transgenico e *F. virginiana*, altro progenitore di *Fragaria x ananassa*, di seguito discussi.

Infatti, quando la *F. virginiana* era la specie portaseme i caratteri transgenici sono stati trasmessi alla progenie. In questo caso si è ottenuto un valore percentuale pari a 50 per i semi germinati (sia per il saggio GUS che per l'analisi in PCR dei due geni inseriti, Tab. 14b, 16) e 59.6 per i semi non germinati (Tab. 14a). Questi dati relativi alla sola F1 indicano un rapporto tra progenie transgenica e non transgenica di 1:1.

Nel caso degli incroci in cui era coinvolta la specie *F. vesca*, mettendo a confronto i risultati dei saggi GUS ottenuti sui semi con quelli condotti sulle foglie delle piante germinate, si può notare la presenza di alcune discordanze. Innanzitutto occorre ricordare che in Italia la *F. vesca* (fragolina di bosco, diploide) è una specie spontanea, per cui era particolarmente importante indagare la possibilità di flusso genico tra questa e la *Fragaria x ananassa*. Gli incroci effettuati con le cv Ilaria, Zimbaro e Snovit hanno sempre permesso la raccolta di semi; il saggio GUS su semi non germinati è risultato positivo per le varietà Ilaria (10.9%) e Snovit (8,1%), mentre per la varietà Zimbaro non si sono avuti semi GUS-positivi. Nel caso dello stesso saggio GUS su semi germinati questo era sempre negativo per le piante delle varietà Snovit ed Ilaria, mentre per la varietà Zimbaro si aveva

un solo caso, pari allo 0,5% (su 211 piante ottenute da germinazione dei semi) GUS-positivo. Inoltre, i risultati dell'analisi PCR per i due geni della cassetta, *nptII* e *uidA*, confermavano i dati ottenuti dal saggio GUS su semi germinati, oltre che quelli ottenuti dalla selezione su kanamicina (Tab. 15), dove però una pianta di Zimbaro, *nptII*-positiva alla PCR, mostrava chiari sintomi di clorosi quando veniva posta su terreno addizionato dell'antibiotico kanamicina. In questo caso si potrebbe ipotizzare un basso livello di espressione del gene *nptII*, come già riscontrato in petunia (Uljan *et al.*, 1994), dove piante trasformate contenenti il gene per la resistenza alla kanamicina, così come confermato da analisi in PCR e Southern blotting, non erano comunque capaci di formare callo in un terreno contenente l'antibiotico. Una seconda ipotesi potrebbe riguardare la metilazione del gene *nptII*; in questo caso si avrebbe comunque una risposta positiva dall'esame in PCR ma l'enzima, proprio perché metilato, non sarebbe in grado di esprimersi, così come accade anche in petunia (Meyer *et al.*, 1992; Uljan *et al.*, 1994; Uljan *et al.*, 1996). Diversi studi hanno confermato l'ipotesi della metilazione quale responsabile della variazione di espressione genica. In tabacco, la metilazione del gene *nptII* era responsabile di una differente (Matzke *et al.*, 1989) o mancata (Weber *et al.*, 1990) espressione genica; in patata un diverso grado di metilazione era responsabile della variazione di espressione genica per i due enzimi codificati dai geni *nptII* e *uidA* (Ottaviani *et al.*, 1993); in frumento la bassa attività GUS era associata con la metilazione del gene corrispondente (Demeke *et al.*, 1999). In *Arabidopsis thaliana* (Kilby *et al.*, 1992) è stato osservato che piante triploidi ottenute da incrocio tra una diploide e una tetraploide, hanno mostrato un'ereditarietà di tipo non-mendeliano dei transgeni. Tale fenomeno potrebbe essere il risultato di un silenziamento epigenetico, vale a dire dovuto all'inserzione dei transgeni in una regione del genoma suscettibile alla condensazione della cromatina (Demeke *et al.*, 1999), che porterebbe ad uno sbilanciamento nell'espressione del transgene.

Per la cultivar Capitola di *F. x ananassa* l'espressione GUS dei semi germinati è risultata positiva nella totalità dei casi, mentre per i semi non germinati solo un 38.3% di piante era GUS-positivo.

L'analisi Southern blotting con sonde specifiche per *nptII* e *uidA* sui cloni trasformati ottenuti in un precedente lavoro (Monticelli *et al.*, 2002) mostra come la cassetta *nptII:uidA* si sia stabilmente inserita nel genoma (Fig. 17a, b). Tutte le rigenerazioni saggiate, derivanti da due cloni di prima rigenerazione (RI) e cioè 10 (da cv Teodora) e 122 (da cv Egla) e fino alla rigenerazione RIV hanno mostrato l'inserimento dei transgeni nel genoma. Questi risultati dimostrano che l'inserimento dei transgene nel

genoma di *Fragaria* è stabile e specifico per ognuno dei genotipi derivanti dalle due cultivar sottoposte a trasformazione. In particolare, si sono potute identificare due inserzioni nel genoma della fragola digerito con la coppia di enzimi di restrizione EcoRI-HindIII, sia quando venivano utilizzate le sonde per *uidA* che quando venivano impiegate quelle mirate al riconoscimento del gene *nptII* (Fig. 17a). Nel caso delle fragole transgeniche, il cui DNA veniva digerito con la coppia EcoRI-PstI, si sono potute osservare sempre due inserzioni con la sonda per *uidA*, mentre quando veniva impiegata la sonda per *nptII* si sono riscontrate quattro bande (Fig. 17b). Inoltre, si è potuto evidenziare che le rigenerazioni derivanti dal genotipo 10 e 122 conservano lo stesso pattern di espressione sia nel caso dell'ibridazione condotta con le sonde per *nptII* che nel caso dell'ibridazione condotta con le sonde per *uidA*. I due pattern di espressione sono, inoltre, specifici per ognuno dei genotipi derivanti dalle due cultivar sottoposte a trasformazione.

Per quanto riguarda la parte dedicata alla trasformazione con i geni esogeni *gfp* e *pgip*, si è riscontrato che la percentuale di rigenerazione ottenuta dopo l'infezione varia fortemente in dipendenza del tipo di espianto utilizzato: le foglie, infatti, non hanno consentito di ottenere rigeneranti dopo l'infezione, confermando così i dati secondo i quali la competenza migliore per la rigenerazione è data dalle stipole (Monticelli *et al.*, 1995). Purtroppo, nonostante gli sforzi e l'impiego di diversi protocolli di trasformazione presenti in letteratura, non si è arrivati all'individuazione di espianti trasformati. La mancata trasformazione con i tre ceppi batterici di *A. tumefaciens* ingegnerizzati può essere dovuta al sistema impiegato che per quanto riportato in letteratura è genotipo dipendente e prevede basse percentuali di trasformazione (James *et al.*, 1990). Inoltre, in lavori precedenti su *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* (De Buck *et al.*, 2000; Iglesias *et al.*, 2001) è stato osservato che la trasformazione *Agrobacterium*-mediata non è molto precisa, anzi, il 70% degli eventi transgenici contenevano varie sequenze di DNA del plasmide batterico non desiderate che possono interferire nell'espressione del transgene inserito. L'impiego di un sistema alternativo, quale ad esempio il sistema biolistico potrebbe dare risultati migliori (Dai *et al.*, 2001).

Concludendo, fino ad oggi era stato dimostrato il flusso dei transgeni solo all'interno della stessa specie, sia essa *Fragaria x ananassa*, Duch. (James *et al.*, 1990; Monticelli and Damiano, 2002), che all'interno di *F. vesca* L. (James and Davis, 1998).

In questo lavoro, quindi è stato possibile dimostrare la reale possibilità di scambio genico dalle fragole coltivate alle specie ottoploidi parentali, di origine americana (*flusso intra-specifico*) e ad altre con la stessa ploidia, quale la *Fragaria x ananassa*, cv Capitola, che danno origine ad ibridi vitali. Mentre nell'incrocio con la diploide *F. vesca*, cv

Zimbaro è stato osservato un solo caso di trasmissione che ha raggiunto lo stadio di pianta, risultato che può essere considerato rassicurante dal punto di vista di una valutazione del rischio di dispersione dei transgeni nell'ambiente naturale, ma che andrebbe ulteriormente approfondito.

Prospettive future

Visti i risultati ottenuti con esperimenti in condizioni controllate, sarebbe interessante andare a valutare la stabilità d'integrazione dei transgeni all'interno delle successive generazioni in pieno campo, in condizioni sperimentali più prossime a quelle che si attuano in natura. Per definire il tipo di segregazione sono, inoltre, indispensabili esperimenti di re-incrocio.

Infine, andrebbe ulteriormente approfondita la parte della variabilità nell'espressione dei transgeni, ad esempio attraverso lo studio sulla metilazione che di solito si attua sul promotore.

VI

BIBLIOGRAFIA

- Aharoni A, O'Connell AP (2002) Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays. *J Exp Bot* 53:2073–2087
- Aharoni A, Keizer LCP, Bouwmeester HJ, Sun Z, Alvarez-Huerta M, Verhoeven HA, Blaas J, van Houwelingen AMML, De Vos RCH, van der Voet H, Jansen RC, Guis M, Mol J, Davis RW, Schena M, van Tunen AJ, O'Connell AP (2000) Identification of the *SAAT* gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. *Plant Cell* 12:647–661
- Aharoni A, Keizer LCP, Van den Broeck HC, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Bois G, Smit P, De Vos RCH, O'Connell AP (2002) Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and -independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit. *Plant Physiol* 129:1019–1031
- Alsheikh MK, Suso H-P, Robson M, Battey NH, Wetten A (2002) Appropriate choice of antibiotic and *Agrobacterium* strain improves transformation of antibiotic-sensitive *Fragaria vesca* and *F.v. semperflorens*. *Plant Cell Rep* 20:1173–1180
- Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnol* 21:177–181
- Agius F, Amaya I, Botella MA, Valpuesta V (2005) Functional analysis of homologous and heterologous promoters in strawberry fruits using transient expression. *J Exp Bot* 56:37–46
- Arnaud JF, Viard F, Delescluse M, Cuguen J (2003) Evidence for gene flow via seed dispersal from crop to wild relatives in *Beta vulgaris* (Chenopodiaceae): consequences for the release of genetically modified crop species with weedy lineages. *Proc Biol Sci.* 270:1565-71

- Asao H, Nishizawa Y, Arai S, Sato T, Hirai M, Yoshida K, Shinmyo A, Hibi T (1997) Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca humuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene. *Plant Biotechnol* 14:145–149
- Bachelier C, Graham J, Machray G, Manoir J, du Roucou JF, McNicol RJ, Davies H (1997) Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars. *Acta Hort* 439:161-163
- Bajaj Y (1990) Somaclonal variation: origin, induction, cryopreservation and implication in plant breeding. In: Bajaj YPS (Eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, somaclonal variation in crop improvement*, pp. 3-48. Springer-Verlag, Berlino
- Barceló M, El Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Pliego-Alfaro F (1998) Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54:29–36
- Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A (2004) Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol* 135:1865–1878
- Benítez-Burraco A, Blanco-Portales R, Redondo-Nevado J, Bellido ML, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J (2003) Cloning and characterization of two ripening-related strawberry (*Fragaria* × *ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes. *J Exp Bot* 54:633–645
- Bennett R, Phipps R, Strange S, Grey P (2004) Environmental and human health impacts of growing genetically modified herbicide-tolerant sugar beet: a life-cycle assessment. *Plant Biotechnol* 2:273–278
- Bevan M (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12:8711–8721

- Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:156–173
- Birch RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:297–326
- Bizily SP, Rugh CL, Summers AO, Meagher RB (1999) Phytoremediation of methyl mercury pollution: merB expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:6808–6813
- Blanco-Portales R, López-Ráez JA, Bellido ML, Moyano E, Dorado G, González-Reyes JA, Caballero JL, Muñoz-Blanco J (2004) A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring. *Plant Mol Biol* 55:763–780
- Blando F, Niglio A, Frattarelli A, Speranza S and Damiano C (1993) Cell suspension cultures in strawberry: growth characterisation and variability. *Acta Hortic. (In Vitro Culture)*, 336: 257-262
- Bock R, Khan MS (2004) Taming plastids for a green future. *Trends Biotechnol* 22:311–318
- Bourlaug NE (2005) Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1997, 3:119-127
- Boxus PH (1974) The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.*, 49: 209-210
- Boxus PH, Quoirin M and Laine JM (1977) Large scale propagation of strawberry plants from tissue culture. In: J. Reinert J and Bjaaj YPS (Eds), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, pp. 130-143. Springer-Verlag, Berlin

- Boxus PH, Damiano C and Brasseur E (1984) Strawberry. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR and Yamada Y. (Eds): Handbook of Plant Cell Culture 3 (17), pp. 453-486. Macmillan, Inc.
- Boxus PH e Druart P (1986) Virus free tree through tissue culture. In Biotechnology in agriculture, pp. 24-30. Springer –Verlag
- Boxus PH (1992) Mass propagation of strawberry and new alternatives for some horticultural crops. In: Kurata K, Kozai T (eds) Transplant production systems. Kluwer, Dordrecht, pp
- Bradford KJ, Deynze AV, Gutterson N, Parrott W, Strauss SH (2005) Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics. Nat Biotechnol 23:439–443 151–162
- Brown K (2001) Seeds of concern. Sci Am 284:52–57
- Butterfield MK, Irvine JE, Valdez Garza M and Mirkov, TE (2002) Inheritance and segregation of virus and herbicide resistance transgenes in sugarcane. Theor Appl Genet 104: 797-803.
- Byrne P (2004) Labelling of genetically engineered foods: food and nutrition series. (<http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09371.html>)
- Cameron JS and Hancock JF (1986) Enhance vigor in vegetative progeny of micropropagated strawberry plants. Hort. Sci., 21: 1225-1226
- Carpenter JE, Gianessi LP (2001) Agricultural biotechnology: updated benefit estimates. National Center for Food and Agricultural Policy, Washington, DC
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2000) Ecological impact assessment. Science source for food, agricultural, and environmental issues. Ames, IA, USA: CAST (<http://www.cast-science.org/pubs/croptregulation.pdf>)

- CAST (Council for Agricultural Science and Technology) (2001) Evaluation of the US Regulatory Process for Crop Developed Through Biotechnology. Issue Paper 19. Ames, IA, USA: CAST (<http://www.cast-science.org/pubs/cropregulation.pdf>)
- Castillejo C, de la Fuente JI, Iannetta P, Botella MA, Valpuesta V (2004) Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of *FaPE1*, a ripening-specific isoform. *J Exp Bot* 55:909–918
- Ceccherini MT, Potè J, Kay E, Van VT, Maréchal J, Pietramellara G, Nannipieri P, Vogel TM, Simonet P (2003) Degradation and Transformability of DNA from Transgenic Leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan., pp: 673-678
- Chalavi V, Tabaeizadeh Z, Thibodeau P (2003) Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene. *J Am Soc Hortic Sci* 128:747–753
- Chamier B, Lorenz MG, Wackernagel W (1993) Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl Environ Microbiol* 59:1662–1667
- Cheng M, Fry JE, Pang S, Zhou H, Hironaka CM, Duncan DR, Conner TW, Wan Y (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971–980
- Chilton M, Drummond M H, Merlo D J, Sciacky D, Montoya A L, Gordon M P, Nester E W (1977) Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cell: the Molecular Basis of Crown Gall Tumorigenesis. *Cell*
- Chrispeels MJ (2000) Biotechnology and the Poor. *Plant Physiology*, 124:3-6

- Civello PM, Powell ALT, Sabehat A, Bennett AB (1999) An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit. *Plant Physiol* 121:1273–1279
- Collins GB, Shepard RG (1996) Engineering Plants for Commercial Products and applications Vol. 792 *Annals New York Academy of Sciences*, New York
- Corazza L, Damiano C, Ialongo M, Frattarelli A and Magnotta A (1994) Fungal fruits rots of strawberry. In: The Third Israele-Italian Phytological Symposium, *Phitoparasitica*, 22 (2): 172
- Cordero de Mesa M, Jiménez-Bermúdez S, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2000) *Agrobacterium* cells as microprojectile coating: a novel approach to enhance stable transformation rates in strawberry. *Aust J Plant Physiol* 27:1093–1100
- Cordero de Mesa M, Santiago-Doménech N, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2004) The *CaMV* 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants. *Plant Cell Rep* 23:32–38
- Dai SH, Zheng P, Marmey P, Zhang SP, Tian WZ, Chen SY, Beachy RN and Fauquet C (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium* mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breeding* 7: 25–33
- Dale A, Sjulín TM (1990) Few cytoplasms contribute to North American strawberry cultivars. *HortScience* 25:1341–1342
- Damiano C (1977) La ripresa vegetativa di piantine di fragola provenienti da coltura *in vitro*. *Frutticoltura*, 2: 3-7
- Damiano C (1978) Il carbone attivo nella coltura *in vitro* della fragola. *Frutticoltura*, 2: 3-7
- Damiano C (1979) Conservazione in frigorifero di colture *in vitro* di fragola e ripresa della moltiplicazione. *Ann. Ist. Sperim. Frutticoltura*, 10: 53-57

- Damiano C, Faedi W and Cobianchi D (1979) Osservazioni agronomiche su piante di fragola *Gorella* ed *Aliso* ottenute da colture *in vitro*. In: Atti Incontro Nazionale S.O.I. Coltura della fragola, pp 65-74. Ferrara
- Damiano C (1980) Strawberry micropropagation. In: Zimmerman R.H. (Ed), Proc. Of the Conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture: application and feasibility, pp. 93-101. USDA-SEA Agricultural Research Results ARR-NE-11. Beltsville, Maryland
- Damiano C, Faedi W and Cobianchi D (1980) Prove di stolonizzazione in vivaio e osservazioni agronomiche su piante di fragola ottenute da colture *in vitro*. Frutticoltura, 42: 51-60
- Damiano C (1986) Tissue culture in germoplasm prpagation and exchange. In: Leon J and Withers LA (Eds.): Guidelines for seed exchange and plant introduction in tropical crops, 76: 179-183. FAO Plant Production and Protection paper
- Damiano C, Ascarelli A, Frattarelli A and Lauri P (1995) Adventitious regeneration and genetic variabilità in strawberry. Acta Hort., 392: 107-114
- Daniell H (2002) Molecular strategies for gene containment in transgenic crops. Nat Biotechnol 20:581–586
- De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. Mol Breed 6:459–468
- De Maagd RA, Bosh D, Stiekema W (1999) *Bacillus thuringiensis* toxinmediated insect resistance in plants. Trends in Plant Science
- de Vries J, Heine M, Harms K, Wackernagel W (2003) Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. Appl Environ Microbiol 69(8):4455-62

- Degnan FH (1997) The food label and the right-to-know. *Food Drug Law J* 52:49–60
- Demeke T, Hucl P, Baga M, Caswell K, Leung N, Chibbar RN (1999) Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat. *Theor Appl Genet* 99:947–953
- Doty SL, Shang TO, Wilson AM, Tangen J, Westergreen AD, Newman LA, Strand SE, Gordan MP (2000) Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6287–6291
- Doyle JJ, Doyle JL. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19:11-15
- du Plessis HJ, Brand RJ, Glyn-Woods C, Goedhart MA (1997) Efficient genetic transformation of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) cultivar Selekt. *Acta Hort* 447:289–294
- Duval Y, Angelman F and De Durand-Gasselin T (1995) Somatic embryogenesis and Synthetic seed. *Biotechnology and Agriculture and Forestry*, vol. 30 Y.P.S. Bajaj, ed. Springer Verlag, Berlin 335-352
- Dziadczyk P, Bolibok H, TyrkaM, Hortyński JA (2003) *In vitro* selection of strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) clones tolerant to salt stress. *Euphytica* 132:49–55
- Edge JM, Benedict JH, Carroll JP, Reding HK (2001) Bollgard Cotton: an assessment of global economic, environmental, and social benefits. *J Cotton Sci* 5:1–8
- Ellstrand NC, CA Hoffman (1990) Hybridization as an avenue for the escape of engineered genes. *Bioscience* 40: 438-442
- Ellstrand NC (1992) Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos* 63: 77-86

- El Mansouri I, Mercado JA, Valpuesta V, López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, Quesada MA (1996) Shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fragaria vesca* L. Plant Cell Rep 15:642–646
- Engel KH, Frenzl T, Miller A (2002) Current and future benefits from the use of GM technology in food production. Toxicol Lett 127:329–336
- Engelmann F (1977) In vitro conservation methods. In: Biotechnology and Plant genetic resources. Callow J.A., Ford-Llyd B.V. and Newbury H.J. eds. CAB International, Wallingford, Oxon. 119-161
- Faedi W, Baruzzi G (1997) Le cultivar di fragola. Rivista di Frutticoltura 4:47-53
- Faedi W, Mourgues F, Rosati C (2002) Strawberry breeding and varieties: situation and perspectives. Acta Hort 567:51–59
- Ferber D (1999) GM crops in the cross hairs: Science 28:1662–1666
- Finstad K, Martin RR (1995) Transformation of strawberry for virus resistance. Acta Hort 385:86–90
- Fisher R, Twyman RM, Schillberg S (2003) Production of antibodies in plants and their use for global health. Vaccine 21:820–825
- Fitter A, Perrins J, Williamson M (1990) Weed probability challenged. Biotechnology 8:473
- French CE, Rosser SJ, Davies GJ, Nicklin S, Bruce NC (1999) Biodegradation of explosives by transgenic plants expressing pentaerythritol tetranitrate reductase. Nat Biotechnol 17:491–494
- Fryxell PA (1957) Mode of reproduction in higher plants. Botanical Review 23: 135-233

- Fuchs RL, Astwood JD (1996) Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol* 50:83–88
- Garcia S, Ezcurra E, Schoel B, Acevedo F, Soberon J, Snow AA (2005) Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, Mexico. *Proc Natl Acad Sci USA* 35:12338–12343
- Gasser CS and Fraley RT (1989) Genetically engineering of plants for crop improvement. *Science*, 224: 1293-1299
- George EF (1996) Plant propagation by tissue culture. Part 2. Exegetics, Edington
- Gilissen LJW, Metz PLJ, Stiekema WJ, Nap JP (1998) Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants. *Transgenic Res* 7:157–163
- Govil S (2004) Biotechnology for environmentally sustainable development. *Adv Biotech* 200:415–417
- Graff GD, Wright BD, Bennett AB, Zilberman D (2004) Access to intellectual property is a major obstacle to developing transgenic horticultural crops. *Calif Agric* 58:120–126
- Graham J, McNicol RJ, Greig K (1995) Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene. *Ann Appl Biol* 127:163–173
- Graham J, Gordon SC, McNicol RJ (1997) The effect of the CpTi gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae). *Ann Appl Biol* 131:133–139
- Graham J, Gordon SC, Smith K, McNicol RJ, McNicol JW(2002) The effect of the cowpea trypsin inhibitor in strawberry on damage by vine weevil under field conditions. *JHortic Sci Biotechnol* 77:33–40

- Gruchala A, Korbin M, Zurawicz E (2004) Conditions of transformation and regeneration of 'Induka' and 'Elista' strawberry plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 79:153–160
- Halpin C (2005) Genes stacking in transgeneic plants the challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol J* 3:141–155
- Hamill JD, Rounsley S, Spencer A, Gordon T, Rhodes JC (1991) The use of the polymerase chain reaction in plant transformation studies. *Plant Cell Reports* 10: 221-224
- Hammerschlag F, Garcés S, Koch-Dean M, Ray S, Lewers K, Maas J, Smith BJ (2006) In vitro response of strawberry cultivars and regenerants to *Colletotrichum acutatum*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 84:255–261
- Hancock JF (1990) Ecological genetics of natural strawberry species. *HortScience* 25:869-871
- Hancock JF, Luby JJ, Dale A, Callow PW, Serce S, El-Shiek A (2002) Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytica* 126:177–184
- Hannum SM (2004) Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:1–17
- Harper BK, Mabon SA, Leffel SM, Halfhill MD, Richards HA, Moyer KA, Stewart CN (1999) Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants. *Nat Biotechnol* 17:1125–1129
- Harpster MH, Brummell DA, Dunsmuir P (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4- β -glucanase gene in strawberry. *Plant Physiol* 118:1307–1316

- Harrison LA, Bailey MR, Naylor MW, Ream JE, Hammond BG, Nida DL, Burnette BL, Nickson TE, Mitsky TA, Taylor TA, Fuchs RL, Padgett SR (1996) The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4 is rapidly digested in vitro and is not toxic to acutely gavaged mice. *J Nutr* 126:728–740
- Hartmann HT and Kester DE (1990) La propagazione delle piante : basi scientifiche e applicazioni pratiche . Edizioni Agricole, Bologna
- Hartmann HT, Kester DE, Davies FT (1991) Plant propagation: principles and practices. 5th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs
- Haymes KM, Davis TM (1998) *Agrobacterium*-mediated transformation of ‘Alpine’ *Fragaria vesca*, and transmission of transgenes to R1 progeny. *Plant Cell Rep* 17:279–283
- Heritage J (2004) The fate of transgenes in the human gut. *Nat Biotechnol* 22:170–172
- Hilbeck A, Baumgartner M, Fried PM, Bigler F (1998) Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera:Chrysopidae). *Environ Entomol* 27:480–487
- Hooykaas PJ and Schilperoot RA (1992) The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annu. Rev. Phytopathology* 32: 157-179
- Houde M, Dallaire S, N’Dong D, Sarhan F (2004) Over-expression of the acidic dehydrin WCOR410 improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves. *Plant Biotechnol J* 2:381–387
- Huang J, Pray C, Rozelle S (2002) Enhancing the crops to feed the poor. *Nature* 418:678–684
- Iannetta PPM, Medina-Escobar N, Ross HA, Souleyre EJF, Hancock RD, Witte C-P, Davies HV (2004) Identification, cloning and expression analysis of strawberry

- (*Fragaria* × *ananassa*) mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase. *Physiol Plant* 121:15–26
- Iglesias VA, Moscone EA, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan T, Spiker S, Matzke M, Matzke AJM (1997) Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. *Plant Cell* 9: 1251–1264
- ISB News Report (2001) Genetically modified crops and foods: a report of the AMA Council on scientific affairs. (<http://www.isb.vt.edu/news/2001/Jan01.pdf>)
- Jaffe G (2005) Withering on the vine will agricultural Biotech's promises bear fruit? (Center For Science in the Public interest. Washington, DC 2005). (http://cspinet.org/new/pdf/withering_on_the_vine.pdf)
- James DJ, Passey AJ, Barbara DJ (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) using disarmed binary vectors. *Plant Sci* 69:79–94
- James DJ, Passey AJ, Eastbrook MA, Solomon MG, Barbara DJ (1992) Progress in the introduction of transgenes for pest and disease resistance into strawberries. *Phytoparasitica* 20:83–87
- James JS (2004) Consumer knowledge and acceptance of agricultural biotechnology vary. *Calif Agric* 58:99–105
- Janmaat AF, Myers J (2003) Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage loopers, *Trichoplusia ni*. *Proc R Soc Lond B* 270:2263–2270
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter* 5(4):387-405

- Jelonkovic G, Chin C, Billings S and Eberhardt J (1991) Trasformation studies in cultivated strawberry, *Fragaria x ananassa* Duch.. In: Dale A and Luby J. (Eds): The strawberry into the XXI century, Cap. 12, pp. 91-97. Timber Press, Portland, Oregon
- Jemmali A, Boxus PH and Kinet JM (1992) Are strawberry plantlets arising from adventitious stipule buds also true type? *Acta Hortic.*, 319: 171-176
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Nevado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002) Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol* 128:751–759
- Jones OP, Waller BJ, Beech MG (1988) The production of strawberry plants from callus cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 12:235–241
- Jones L (1999) Science, medicine and the future. Genetically modified foods. *BMJ* 318:581–584
- Kareiva P, W Morris, CM Jacobi (1994) Studying and managing the risk of crossfertilization between transgenic crops and wild relatives. *Molecular Ecology* 3: 14-21
- Kartha KK, Leung NL and Pahl K (1980) Cryopreservation of strawberry *Fragaria x ananassa* cultivar Redcoat meristems and mass propagation of plantlets. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 105: 481-484
- Khanna M, Stotzky G (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl Environ Microbio* 58:1930–1939
- Kilby NJ, Ottoline Leyser HM, Furner IJ (1992) Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 20:103-112

- Knop W (1865) Quantitative untersuchungen uber die Ernahrungsprozesse der Pflanzen. Landwirtsch. Ver. Stn., 7: 93-107
- Konig A, Cockburn A, Crevel RWR, Debruyne E, Grafstroem R, Hammerling U, Kimber I, Knudsen I, Kuiper HA, Peijnenburg AACM, Penninks AH, Poulsen M, Schauzu M, Wal JM (2004) Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Food Chem Toxicol 42:1047–1088
- Laneri U and Damiano C (1980) Strawberry anther culture. Annali dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, 11: 43-48
- Lazarus CM, Macdonald H (1996) Characterization of a strawberry gene for auxin-binding protein, and its expression in insect cells. Plant Mol Biol 31:267–277
- Leffel SM, Mabon SA, Stewart CN Jr (1997) Application of green fluorescent protein in plants. Biotechniques 23:912–918
- Leist N (1999) Meeting the Needs of the Markets for Seed Worldwide. Proc. Of the World Seed Conference, Cambridge UK, 6-8 Sept., 47-50
- Liu ZR, Sanford JC (1988) Plant regeneration by organogenesis from strawberry leaf and runner tissue. Hort Science 23:1057–1059
- Llop-Tous I, Domínguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M (1999) Characterization of two divergent endo- β -1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the non climacteric strawberry fruit. Plant Physiol 119:1415–1421
- López-Aranda JM, Pliego-Alfaro F, López-Navidad I, Barceló-Muñoz M (1994) Micropropagation of strawberry (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.). Effect of mineral salts, benzyladenine levels and number of subcultures on the in vitro and field behaviour of the obtained microplants and the fruiting capacity of their progeny. J Hortic Sci 69:625–637

- Lorenz MG, Wackernagel W (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl Environ Microbiol* 53:2948–2952
- Luria SE, JW Burrous (1957) Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74:461-476
- MacKenzie D (2000) International Comparison of Regulatory frameworks For Food Products of Biotechnology. Ottawa, Canada: Canadian Biotechnology Advisory Committee, p. 62
(http://www.cbaccccb.ca/documents/en/InternatComparisons_MacKenzie.pdf)
- Manning K (1994) Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin. *Planta* 194:62–68
- Manning K (1998) Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits. *Planta* 205:622–631
- Marta AE, Camadro EL, Díaz-Ricci JC, Castagnaro AP (2004) Breeding barriers between the cultivated strawberry, *Fragaria* × *ananassa*, and related wild germplasm. *Euphytica* 136:139–150
- Martinez GA, Chaves AR, Civello PM (2004) β -xylosidase activity and expression of a β -xylosidase gene during strawberry fruit ripening. *Plant Physiol Biochem* 42:89–96
- Martinez M, Abraham Z, Gambardella M, Echaide M, Carbonero P, Diaz I (2005) The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytocystatin with antifungal properties. *J Exp Bot* 56:1821–1829
- Mathews H, Wagoner W, Kellogg J, Bestwick R (1995) Genetic transformation of strawberry: stable integration of a gene to control biosynthesis of ethylene. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 31:36–43

- Mathews H, Dewey V, Wagoner W, Bestwick RK (1998) Molecular and cellular evidence of chimaeric tissues in primary transgenics and elimination of chimaerism through improved selection protocols. *Transgenic Res* 7:123–129
- Matzke MA, Primig M, Trnovsky J, Matzke AJM (1989) Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *Plant Mol Biol*. 16:821-830
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Moyano E, Caballero JL, Muñoz-Blanco J (1997) Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening-specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants. *Plant Mol Biol* 34:867–877
- Medina-Escobar N, Cardenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (1998) Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding to a mRNA for a low-molecular-weight-heat-shock protein. *Plant Mol Biol* 36:33–42
- Mehli L, Schaart JG, Kjellsen TD, Tran DH, Salentijn EMJ, Schouten HJ, Iversen T-H (2004) A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry. *New Phytol* 163:99–110
- Messeguer J (2003) Gene flow assessment in transgenic plants. [*Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 73 \(3\):201-212](#)
- Meyer P, Linn F, Hidmann IH, Meyer HA, Niedenhof I, Saedler H (1992) Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen Genet* 231:345-352
- Mezzetti B, Landi L, Scortichini L, Rebori A, Spena A, Pandolfini T (2002) Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in strawberry. *Acta Hort* 567:101–104

- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A (2004) The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol* 4:4
- Miller AR, Chandler CK (1990) Plant regeneration from excised cotyledons of mature strawberry achenes. *HortScience* 25:569–571
- Miller M, Tagliani Laura, Wang N, Berka B, Bidney D and Zhao ZY (2002) High efficiency transgene segregation in co-transformed maize plants using an *Agrobacterium tumefaciens* 2 T-DNA binary system. *Transgenic Research* 11: 381–396
- Monciardini P, Podini D, Marmioli N (1998) Exotic gene expression in transgenic plants as a tool for monitoring environmental pollution. *Chemosphere* 37:2761–2772
- Monticelli S, Damiano C and Gallelli A (1995) Regeneration from strawberry stipules. *Med. Fac. Landbouww. Univ. gent*, 60, (4a): 1679-1682
- Monticelli S, Damiano C and Nicolini S (1995) Trasformation and regeneration in apple ad strawberry. In: *Molecular aspects of differentiation and transformation. Meeting of Cost 822 working group IV*. Lisbona
- Monticelli S, Gentile A, Damiano C (2002) Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in stipules of strawberry. *Acta Hort* 567:105–107
- Morgan A, Baker CM, Chu JSF, Lee K, Crandall BA, Jose L (2002) Production of herbicide tolerant strawberry through genetic engineering. *Acta Hort* 567:113–115
- Moyano E, Portero-Robles I, Medina-Escobar N, Valpuesta V, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (1998) A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process. *Plant Physiol* 117:711–716
- Moyano E, Encinas-Villarejo S, López-Ráez JA, Redondo-Nevado J, Blanco-Portales R, Bellido ML, Sanz C, Caballero JL, Muñoz-Blanco J (2004) Comparative study

- between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Sci* 166:835–845
- Mullin RH and Schlegel DE (1976) Cold storage maintenance of strawberry meristematic plantlets. *Hort. Sci.*, 11: 100-101
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant. Cell. Physiology.*, 38 (2): 113-123
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. *Proc. Inter. Plant. Prop. Soc.*, 16: 80-88
- Murashige T (1997) Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Hort.* 78: 17-30
- Nam Y-W, Tichit L, Leperlier M, Cuerq B, Marty I, Lelièvre J-M (1999) Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (*Fragaria vesca* L.) fruits. *Plant Mol Biol* 39:629–636
- Nap JP, Metz PLZ, Escaler M, Conner AJ (2003) The release of genetically modified crops into the environment. Part I. Overview of current status and regulations. *Plant J* 33:1–18
- Ndong C, Ouellet F, Houde M, Sarhan F (1997) Gene expression during acclimation in strawberry. *Plant Cell Physiol* 38:863–870
- Nehra NS, Stushnoff C, Kartha KK (1989) Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks. *J Am Soc Hortic Sci* 114:1014–1018
- Nehra NS, Stushnoff C, Kartha KK (1990a) Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). *Plant Sci* 66:119–126

- Nehra NS, Chibbar RN, Kartha KK, Datla RSS, Crosby WL, Stushnoff C (1990b) Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep* 9:293–298
- Nehra SN, Kartha KK, Stushnoff C and Giles KL (1992) The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 29: 257-268
- Netherwood T, M Martín-Orúe S, G O'Donnell A, Gockling S, Graham J, Mathers JC, Gilbert HJ (2004) Assessing the survival of transgenic plant DNA in the human gastrointestinal tract. *Nat Biotechnol* 22:204–209
- Nicotra A (1997) Scelte varietali: aggiornamento del progetto finalizzato del MiRAAF. *Rivista di Frutticoltura*, 4:9-10
- Nielsen KM, Smalla K, van Elsas JD (2000) Natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 with cell lysates of *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, and *Burkholderia cepacia* in soil microcosms. *Appl Environ Microbiol.* 66(1):206-12
- Nordlee JA, Taylor ST, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK (1996) Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybean. *N Engl J Med* 334:688–692
- Nyman M, Wallin A (1988) Plant regeneration from strawberry (*Fragaria × ananassa*) mesophyll protoplasts. *J Plant Physiol* 133:375–377
- Nyman M, Wallin A (1992) Transient gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) protoplasts and the recovery of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11:105–108
- Ogura H (1990) Chromosome variation in plant tissue culture. In: Bajaj YPS (Eds), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Somaclonal variation in crop improvement*, 11, pp. 19-75. Springer-Verlag, Berlino, Heidelberg

- Ottaviani MP, Smits T, Hanisch ten Cate CH (1993) Differential methylation and expression of β -glucoronidase and neomycin phosphotransferase genes in transgene plants of potato cv ' Bintje'. *Plant Sci* 88:73-81
- Owen HR, Miller AR (1996) Haploid plant regeneration from anther cultures of three North American cultivars of strawberry (*Fragaria* $\times$ *ananassa* Duch.). *Plant Cell Rep* 15:905–909
- Owens CL, Thomashow MF, Hancock JF, Iezzoni AF (2002) CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry. *J Am Soc Hortic Sci* 127:489–494
- Owens CL, Iezzoni AF, Hancock JF (2003). Enhancement of freezing tolerance of strawberry by heterologous expression of *CBF1*. *Acta Hort.* 626:93-100
- Paine JA (2005) Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nature Biotechnology* 23, 482 – 487
- Pereira A (2000) A transgenic perspective on plant functional genomics. *Transgenic Res* 9:245–260
- Perkins-Veazie P (1995) Growth and ripening of strawberry fruit. *Hortic Rev* 17:267–297
- Perr HA (2002) Children and genetically engineered food: potentials and problems. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 35:475–486
- Pew Initiative on food and Biotechnology (2004) Issues in the regulation of genetically engineered plants and animals. (Washington, DC 2004). (<http://pewagbiotech.org/research/regulation/Regulation.pdf>)
- Pierik RLM (1987) *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, pp. 3-138. Dordrecht, Boston, Lancaster

- Pliego-Alfaro F, Jiménez-Bermúdez S, Muñoz-Blanco J, Caballero-Repullo JL, Trainotti L, Casadoro G, Valpuesta V, Barceló-Muñoz M, Cordero de Mesa M, Quesada-Felice MA, Mercado-Carmona JA (2002) Effects of pectate lyase and cellulase genes, in antisense expression, on modification of strawberry fruit softening. Proc 10th IAPTC&B (International Association for Plant Tissue and Biotechnology) Congr, Florida, p 101-A
- Preininger E, Zatyko J, Szucs P, Korani P and Gyurjan I (1997) *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria x ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant., 33:190-19
- Pritts M (2002) Growing strawberries, healthy communities, strong economies and clean environments: what is the role of researcher? *Acta Hort* 567:411–417
- Quarta R, Nati D and Paolini FM (1991) Strawberry anther culture. *Acta Hort.*, 300: 335-339
- Randy V (2001) Plant biotechnology. Biotechnology information. Virginia cooperative extension. (<http://www.ext.vt.edu/pubs/biotech/443-004/443-004.pdf>)
- Raybould AF, Gray AJ (1993) Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *J Appl Ecol* 30:199–21
- Redenbaugh K, McHughen A (2004) Regulatory challenges reduce opportunities for horticultural biotechnology. *Calif Agric* 58:106–119
- Redondo-Nevado J, Moyano E, Medina-Escobar N, Caballero JL, Muñoz-Blanco J (2001) A fruit specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler). *J Exp Bot* 52:1941–1945
- Regal PJ (1994) Scientific principles for ecologically based risk assessment of transgenic organisms. *Mol Ecol* 3:5–13

- Rissler J, Mellon M (1993) Perils amidst the promise: ecological risks of transgenic crops in a global market. Union of Concerned Scientists, Cambridge, USA
- Romanowsky G, Lorenz MG, Wackernagel W (1993) Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl Environ Microbiol* 59: 3438–3446
- Rommens CM, Humara JM, Ye JS, Yan H, Richael C, Zhang L, Perry R, Swords K (2004) Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol* 35:421–431
- Rooke L, Steele SH, Barcelo P, Shewry PR, Lazzeri PA (2003) Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat. *Euphytica* 129:301-309
- Rosati P, Devreux M and Laneri U (1975) Anther culture of strawberry. *HortScience*, 10: 119-120
- Roskopf E (1999) Report of the berry working group (Strawberry, Raspberry/Blackberry, Blueberry). In: Traynor PL, Westwood JH (eds) *Ecological effects of pest resistance genes in managed ecosystems*. Information Systems for Biotechnology, Blacksburg, pp 67–72, <http://www.isb.vt.edu>
- Rugh CL (2004) Genetically engineered phytoremediation: one man's trash is another man's transgene. *Trends Biotechnol* 22:496–498
- Rugienius R, Stanys V (2001) In vitro screening of strawberry plants for cold resistance. *Euphytica* 122:269–277
- Rugini E, Orlando R (1992) High efficiency shoot regeneration from calluses of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) stipules of in vitro shoot cultures. *J Hortic Sci* 67:577–582

- Salentijn EMJ, Aharoni A, Schaart JG, Boone MJ, Krens FA (2003) Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiol Plant* 118:571–578
- Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Ed.2. Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, NY
- Sansavini S, Rosati P, Gaggioli D & Toschi F (1991) Ereditarietà e stabilità di variazioni somatiche in fragile micropropagate. *Rivista di Frutticoltura* 9: 85-91
- Saxena D, Flores S, Stotzky G (1999) Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402:480
- Schaart JG, Salentijn EMJ, Krens FA (2002) Tissue-specific expression of the β -glucuronidase reporter gene in transgenic strawberry (*Fragaria* $\times$ *ananassa*) plants. *Plant Cell Rep* 21:313–319
- Schaart JG, Krens FA, Pelgrom KTB, Mendes O, Rouwendal GJA (2004) Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. *Plant Biotechnol J* 2:233–240
- Schoenly KG, Cohen MB, Barrion AT, Zhang W, Gaolach B, Viajante VD (2003) Effects of *Bacillus thuringiensis* on nontarget herbivore and natural enemy assemblages in tropical irrigated rice. *Environ Biosafety Res* 2:181–206
- Sesmero R, Quesada MA, Mercado JA(2007) Antisense inhibition of pectate lyase gene expression in strawberry fruit: characteristics of fruits processed into jam. *J Food Eng* 79:194–199
- Shestibratov KA, Dolgov SV (2005) Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*. *Sci Hort* 106:177–189
- Sjulin TM, Dale A (1987) Genetic diversity of North American strawberry cultivars. *J Am Soc Hortic Sci* 112:375–385

- Sjulin TM (2003) The North American small fruit industry 1903–2003. II. Contributions of public and private research in the past 25 years and a view to the future. Hort Science 38:960–967
- Sorvari S, Ulvinen S, Hietaranta T, Hiirsalmi H (1993) Preculture medium promotes direct shoot regeneration from micropropagated strawberry leaf disks. HortScience 28:55–57
- Southgate EM, Davey MR, Power JB and Marchant R. (1995) Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment. In: Biotechnology Advances, 13: 631-651
- Sowik I, Bielenin A, Michalczyk (2001) In vitro testing of strawberry resistance to *Verticillium dahliae* and *Phytophthora cactorum*. Sci Hort 88:31–40
- Spolaore S, Trainotti L, Pavanello A, Casadoro G (2003) Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo- β -1,4-glucanases in the non-climacteric strawberry. J Exp Bot 54:271–277
- Sung ZR, Fieberg A, Chorneau R, Borkird C, Furner I, Smith J, Terzi M, Lo Schiavo F, Giulliano G, Pitto L and Nuti-Ronchi V (1984) Development biology from embryogenesis carrot culture. Plant Molecular Biology Reporter, 2: 3-14
- Suslow, TV (2002) Biotechnology Provides New Tools for Plant Breeding. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. V.sito anrcatalog.ucdavis.edu per un compendio sulle principali tecniche di ingegneria genetica.
- Swartz Hj, Galetta GJ and Zimmerman RH (1981) Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberry *Fragaria x ananassa*. J. americ. Soc. Hort. Sci., 106: 667-673

- Tabashnik BE (1994) Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol* 39:47–79
- Tabashnik BE, Liu YB, Malvar T, Heckel DG, Masson L, Ballester V, Granero F, Mensua JL, Ferre J (1997) Global variation in the genetic and biochemical basis of diamond-back moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12780–12785
- Tabe L, Higgins TJ (1998) Engineering plant protein composition for improved nutrition. *Trends in Plant Science*
- Tian M, Gu Q, Zhu M (2003) The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Sci* 165:701–707
- Toyoda H, Horikoshi K, Yamano Y, Ouchi S (1991) Selection for *Fusarium* wilt disease resistance from regenerants derived from leaf callus of strawberry. *Plant Cell Rep* 10:167–170
- Trainotti L, Spolaore S, Pavanello A, Baldan B, Casadoro G (1999) A novel E-type endo- β -1,4-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits. *Plant Mol Biol* 40:323–332
- Trainotti L, Spinello R, Piovan A, Spolaore S, Casadoro G (2001) β -Galactosidases with a lectin-like domain are expressed in strawberry. *J Exp Bot* 52:1635–1645
- UK GM Science Review Panel (2003) GM Science Review. First Report. An open Review of the Science relevant to GM crops and food based on interests and concerns of the public (UK Government, London, 2003). (<http://www.gmsciencedebate.org.uk/report/pdf/gmsci-report1-full.pdf>)
- Ulian EC, Magill JM, Smith RH (1994) Expression and inheritance pattern of two foreign genes in petunia. *Theor Appl Genet* 88:433–440

- Ulian EC, Magill JM, Magill CW, Smith RH (1996) DNA methylation and expression of NPT II in transgenic petunias and progeny. *Theor. Appl. Genet.* 92 :976-981
- Vellicce GR, Díaz Ricci JC, Hernández L, Castagnaro AP (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry. *Transgenic Res* 15:57–68
- Verpoorte R, Van der Heijden R, Memelink J (2000) Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. *Transgenic Research*
- Wang DY, Wergin WP, Zimmerman RH (1984) Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of strawberry. *Hort Science* 19:71–72
- Wang J, Ge H, Peng S, Zhang H, Chen P, Xu J (2004) Transformation of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) with late embryogenesis abundant protein gene. *J Hortic Sci Biotechnol* 79:735–738
- Wang ZY, Lawrence R, Hopkins A, Bell J, Scott M (2004) Pollen-mediated transgene flow in the wind-pollinated grass species tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) *Mol. Breed.* 14:47-60
- Watt K, Graham J, Gordon SC, Woodhead M, McNicol RJ (1999) Current and future transgenic control strategies to vine weevil and other insect resistance in strawberry. *J Hortic Sci Biotechnol* 74:409–421
- Wawrzynczak D, Michalczuk L, Sowik I (2005) Modification in indole-3-acetic acid metabolism, growth and development of strawberry through transformation with maize IAA-glucose synthase gene (*iaglu*). *Acta Physiol Plant* 27:19–27
- Weber H, Ziechmann C, Graessmann A (1990) In vitro DANN methylation inhibits gene expression in transgenic tobacco. *EMBO J.* 9:4409-4415

- Westman AL, Levy BM, Miller MB, Gilles GJ, Spira TP, Rajapakse S, Tonkyn DW, Abbott AG (2001) The potential for gene flow from transgenic crops to related wild species: a case study in strawberry. *Acta Hort.* 560:527-530
- Wilson FD, Flint HM, Deaton WR, Buehler RE (1994) Yield, yield components, and fiber properties of insect-resistant cotton lines containing a *Bacillus thuringiensis* toxin gene. *Crop Sci* 34:38–41
- Woolley LC, James DJ, Manning K (2001) Purification and properties of an endo- β -1,4-glucanase from strawberry and down-regulation of the corresponding gene, *cel1*. *Planta* 214:11–21
- Yan L, Kerr PS (2002) Genetically engineered crops: their potential use for improvement of human nutrition. *Nutr Rev* 60:135–141
- Yonghua Q, Shanglong Z, Asghar S, Lingxiao Z, Qiaoping Q, Kunsong C, Changjie X (2005) Regeneration mechanism of Toyonoka strawberry under different color plastic films. *Plant Sci* 168:1425–1431
- Yongjie W, Englemann F, Frattarelli A, Damiano C and Withers La (1977) Cryopreservation of strawberry cell suspension cultures. *Cryo-letters*, 18: 317-324
- Yubero-Serrano EM, Cordero de Mesa M, de los Santos B, Romero F, Rey M, Llobell A, Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (2002) Obtención de plantas transgénicas de fresa con genes antifúngicos de *Trichoderma* como alternativa a tratamientos químicos no respetuosos con el medio ambiente. *Proc Congr Nac Biotecnol*, Sevilla, p 143
- Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N, Muñoz-Blanco J, Caballero JL (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* 54:1865–1877

Zhang Y, Yin X, Yang A, Li G and Zhang J (2005) Stability of inheritance of transgenes in maize (*Zea mays* L.) lines produced using different transformation methods. *Euphytica* 144: 11–22

Zhao Y, Qingzhong L, Davis RE (2004) Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Rep* 23:224–230