



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E
AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

OTTIMIZZAZIONE DELLA TRASFORMAZIONE
GENETICA MEDIATA DA *AGROBACTERIUM*
TUMEFACIENS PER IL GENE *FveFT2* IN DUE VARIETÀ DI
MORA

Optimization of an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic
transformation for *FveFT2* gene in two blackberry varieties

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
DAMIANO D'ALOISO

Relatore:
PROF. BRUNO MEZZETTI

Correlatore:
DOTT.SSA SILVIA SABBADINI

Co-correlatore:
DOTT.SSA ANGELA RICCI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

1.	Introduzione	1
1.1	Caratteristiche botaniche di <i>Rubus Fruticosus</i> L.....	3
1.2	Esigenze pedoclimatiche e diffusione della coltura nel mondo	5
1.3	Obiettivi del miglioramento genetico su mora	6
1.3.1	Il carattere della rifioritura.....	9
1.4	Classificazione varietale di Loch Ness e Loch Tay	12
1.5	Il miglioramento genetico tramite le biotecnologie	13
1.5.1	Il gene di interesse <i>FveFT2</i>	15
1.5.2	Trasferimento del gene di interesse	16
1.5.3	Rigenerazione delle cellule trasformate	22
2	Scopo della tesi	24
3	Materiali e metodi	26
3.1	Preparazione degli espianti e dei terreni di coltura per le prove di tossicità	27
3.2	Test di tossicità agli antibiotici	28
3.2.1	Test di tossicità a cefotaxime, carbenicillina e timentina	28
3.2.2	Test di tossicità alla kanamicina	29
3.3	Prova di trasformazione	30
3.3.1	Costrutto genico.....	30
3.3.2	Crescita dell' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , infezione dei tessuti vegetali e co-coltura.....	30
3.3.3	Selezione del materiale con l'antibiotico kanamicina e detection GFP	33
3.4	Test statistico utilizzato	34
4	Risultati e discussione	35
4.1	Test di tossicità a cefotaxime, carbenicillina e timentina	35
4.2	Test di tossicità alla kanamicina.....	40
4.3	Prova di trasformazione genetica mediata da <i>A. tumefaciens</i>	45
5	Conclusioni.....	49

6 Bibliografia.....	52
---------------------	----

1. INTRODUZIONE

Il rovo comune, *Rubus fruticosus* L., è una pianta arbustiva caducifoglie della famiglia delle *Rosaceae*, che si ritiene sia originaria dell'Armenia e ora presente ovunque, in Europa, Asia, Oceania e Nord e Sud America (*Mihammad Zia-Ul-Haqet al., 2014*). Il frutto del rovo è la mora, che così come gli altri piccoli frutti, sta vivendo da diversi anni un periodo di crescente popolarità e di consumo in tutto il mondo.

Un tempo le more erano considerate solo un frutto selvatico, oggi la coltivazione di questa pianta domestica è diventata importante in molti Paesi del mondo. Questa espansione si è verificata poiché i consumatori in molte aree del mondo hanno sviluppato un crescente interesse per i frutti di bosco e per i benefici che apportano alla salute, di cui le more offrono sostanziali livelli di antiossidanti. Pertanto, le more hanno integrato altri frutti di bosco nell'interesse ampliato dei consumatori (*Clark & Finn, 2014*).

L'espansione dell'industria delle more è stata rapida e consistente. Nuove cultivar di qualità superiore, pratiche di produzione innovative e nuove regioni di produzione si sono combinate per rendere questo frutto disponibile al consumatore fresco e tutto l'anno (*Clark & Finn, 2014*). L'introduzione nel mercato di nuove cultivar caratterizzate da frutti di alta qualità e date di raccolta più estese, potrebbero portare ad un'ulteriore espansione di questa coltura.

È circa dalla metà del 1800 che l'uomo iniziò a selezionare le caratteristiche migliori o, più tipicamente nelle fasi iniziali, nuove caratteristiche nelle piante di *Rubus* destinate alla coltivazione.

La selezione in *Rubus* risulta tutt'ora complicata a causa di numerosi fattori, quali: la poliploidia, l'alto livello di eterozigosi presente nelle specie, la mancanza di diversità genetica in molte cultivar d'élite e la mancanza di donatori naturali dei caratteri desiderati. Da diversi anni la rifioritura è uno dei caratteri più innovativi e più difficili nella selezione delle more.

Un'alternativa promettente per superare questi vincoli è il trasferimento e l'espressione dei geni di interesse in una determinata specie vegetale mediante l'uso di strumenti biotecnologici.

L'incorporazione di DNA esogeno nelle colture mediante l'uso di *Agrobacterium tumefaciens* è una delle tecniche più utilizzate nell'ambito della trasformazione genetica, che

richiede in una prima fase l'ottimizzazione di protocolli di rigenerazione *in vitro* delle piante dalle poche cellule trasformate.

Anche se per alcune specie esiste già un sistema di rigenerazione adeguato, è noto che lo stato transgenico delle cellule potrebbe influenzare negativamente la loro capacità di rigenerazione e pertanto sono necessarie successive modifiche del protocollo di rigenerazione (A. Gajdošová *et al.*, 2015).

Uno dei principali ostacoli alla trasformazione genetica della mora, mediante *A. tumefaciens*, è rappresentato dall'utilizzo di un corretto sistema di rigenerazione delle cellule trasformate.

I protocolli di rigenerazione per le piante di mora sono spesso genotipo specifici a causa dell'elevata variabilità genetica presente nella specie. L'efficienza di rigenerazione *in vitro* delle cellule trasformate è inoltre influenzata dalla presenza di antibiotici all'interno dei terreni di selezione/rigenerazione, ai quali la specie risulta sensibile.

Nella seguente tesi, dopo una parte introduttiva dedicata alla mora in generale e ai vari aspetti del miglioramento genetico di questa specie, verrà riportato il lavoro sperimentale dedicato all'ottimizzazione dei terreni di selezione/rigenerazione utilizzati per la successiva prova di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* per il carattere della rifioritura nelle due cultivar di mora, Loch Ness e Loch Tay.

1.1 Caratteristiche botaniche di *Rubus Fruticosus* L.

Rubus fruticosus L., comunemente chiamato rovo o rovo di mora, è un arbusto sarmentoso appartenente alla famiglia delle *Rosaceae* e al genere *Rubus*.

La mora è il nome comune del frutto di *Rubus fruticosus* L. e di ibridi interspecifici o intergenerici di diverse varietà del genere *Rubus* che rientrano nella categoria commerciale dei frutti di bosco o piccoli frutti.

Il rovo è una ceppaia perenne con il fusto sotterraneo trasformato in rizoma e la parte aerea costituita da fusti annuali (polloni) e biennali (tralci fruttiferi).

I polloni (tralci nel secondo anno) hanno un ciclo biennale e presentano una notevole vigoria (3-4 m); questi possono essere radicali, se generati da gemme poste lungo le radici o del colletto se sorgono alla base della pianta. I tralci possono avere un portamento eretto, semi eretto e strisciante, il che determina l'habitus vegetativo della pianta.

L'apparato radicale è ben sviluppato e presenta radici primarie tozze e rizomatose mentre quelle secondarie sono più superficiali e fascicolate. La presenza di gemme sulle radici consente la propagazione del rovo per propaggine o capogatto.

Le foglie del rovo sono decidue, imparipennate o palmate composte, con 3-5 foglioline a lamina ovata, margini finemente seghettati e spinosi e apice acuto; la pagina superiore è di colore verde scuro e può presentare striature di colore marrone, differentemente la pagina inferiore è di un verde più chiaro. A seconda della varietà si possono trovare o meno spine sulla nervatura centrale e sul picciolo. Alla base della foglia sono presenti due piccole stipole, chiamate volantini.

I fiori sono tipici delle *Rosacee*, ermafroditi, costituiti da cinque sepali, cinque petali di colore bianco o rosaceo, ed un elevato numero di pistilli e stami. L'impollinazione del rovo è entomofila, operata da api e altri insetti impollinatori, ma data la leggerezza del polline, l'impollinazione può anche avvenire a causa del vento. Ogni cima contiene 8-80 fiori che sbocciano in modo sfalsato: la fioritura inizia dalla sommità dello stelo e progredisce verso il basso, durando per circa tre settimane (i fiori nei nostri ambienti sono prodotti dalla tarda primavera all'inizio dell'estate su brevi racemi).

Il frutto del rovo, la mora, è un frutto aggregato composto da diverse drupeole poste attorno ad un picciolo e ognuna di esse contiene un seme; il ricettacolo a maturità non si separa dal frutto (come nel caso del lampone) ma vi resta attaccato. Generalmente il frutto è nero e lucido, nonostante esistano varietà con il frutto di colore rosso o rosso scuro, che presenta sulla superficie un rivestimento ceroso; può essere di forma sferica, conica e cilindrica.

La maggior parte delle varietà di mora presenti nel mercato sono unifere, presentando una fioritura ed una successiva fruttificazione che avviene sui tralci fruttiferi del secondo anno. Poche cultivar e alcuni genotipi selvatici presentano il carattere della rifioritura, che permette oltre ad un normale ciclo di fioritura e fruttificazione sui tralci fruttiferi, anche una fioritura e fruttificazione sui polloni del primo anno durante la fine della stagione di crescita degli stessi (autunno).

La maturazione dei frutti nei tralci fruttiferi, nei nostri ambienti, avviene a partire da giugno fino a metà settembre, in base alla quale sono state suddivise in precoci (inizio giugno), medie (da fine giugno a metà-fine luglio) e tardive (da fine luglio a metà settembre).

1.2 Esigenze pedoclimatiche e diffusione della coltura nel mondo

Rispetto agli altri frutti di bosco, il rovo è una specie più rustica, che si adatta a diverse condizioni pedoclimatiche. Cresce bene in terreni irrigati, leggeri e freschi, adattandosi anche a terreni poveri; può svilupparsi in terreni con un pH da 5 a 7,5, preferendo un pH leggermente acido, tra 6 e 6,5.

Rispetto ad altri frutti di bosco la mora beneficia di molta esposizione solare, che rende i frutti più zuccherini e gradevoli al gusto.

Il rovo viene coltivato in zone a clima temperato-continentale e cresce e fruttifica bene su terreni con una discreta presenza di sostanza organica, al riparo dai venti freddi, sui pendii esposti a sud e in zone con sufficiente umidità, i ristagni idrici possono provocare diverse malattie, in particolare la muffa grigia (*Botrytis cinerea*).

La produzione mondiale di more ha raggiunto il suo massimo storico nel 2019 con 922681 t, con una crescita media annua del 3,4% per il periodo dal 2000 al 2019, indicando una stabilità mondiale nella produzione di questa coltura, con una crescita non esplosiva ma costante (*Blackberry analysis, 2021*).

I principali Paesi produttori di more a livello mondiale sono, in ordine di importanza: la Spagna, il Messico, gli Stati Uniti d'America, il Marocco e il Portogallo.

Negli ultimi anni c'è stato un incremento di produttività di more, sia a livello italiano che europeo. L'espansione della coltivazione della mora è dovuta soprattutto al contributo di diverse cooperative e gruppi di produttori interessati ad aumentare la disponibilità del prodotto fresco per tutto l'anno.

In Italia le maggiori coltivazioni di more si incontrano in Trentino e Piemonte, oltre che in Emilia-Romagna, anche se negli ultimi anni si è avuta un'ampia diffusione nelle regioni Centro e del Sud Italia.

1.3 Obiettivi del miglioramento genetico su mora

Attualmente si conoscono circa 300 varietà di mora, molte delle quali derivate da intensi programmi di miglioramento genetico che negli ultimi venti anni hanno portato alla realizzazione di oltre cinquanta nuove cultivar, queste sono per lo più tetraploidi e provengono da selezione e ibridazione di diverse specie appartenenti al genere *Rubus*.

Le attuali varietà commerciali sono derivate da incroci di specie molto diverse morfologicamente e geneticamente eterogenee (*Moore e Skirvin, 1990*), che permettono di coltivare more in ambienti pedologicamente diversificati. Due limiti di considerevole importanza per questa coltura sono determinati da uno standard qualitativo dei frutti non sempre apprezzabile dal consumatore, ed una ridotta disponibilità di cultivar che siano in grado di estendere o forzare il periodo di produzione (*Clark & Finn, 2008*).

I programmi di selezione e di miglioramento genetico delle piante appartenenti al genere *Rubus* riguardano diversi aspetti e caratteristiche che sono elencati in breve nella parte sottostante.

- Qualità dei frutti. È opinione comune che il miglioramento della qualità dei frutti riveste ancora oggi un importante ruolo nel miglioramento genetico della mora. Indipendentemente dal fatto che la frutta venga lavorata o utilizzata fresca, esistono una serie di caratteristiche qualitative di interesse primario per il miglioramento genetico, tra cui il sapore del frutto (dolcezza, acidità, astringenza, componenti aromatiche, ecc.), il colore, la consistenza, la facilità di estrazione del frutto da raccolto e le caratteristiche dei semi (dimensioni e sensazione in bocca durante il consumo) (*Clark & Finn, 2008*).

Clark (2005) ha affermato che "l'opportunità più importante per migliorare il consumo delle more degli Stati Uniti orientali è quella di aumentare la dolcezza delle bacche insieme a livelli ridotti di acidità e astringenza". Inoltre, si potrebbe ampliare la possibilità che questa opportunità possa essere applicata a livello mondiale (*Clark & Finn, 2008*).

- Taglia dei frutti. Il progresso nella dimensione dei frutti (solitamente misurata in base al peso) è stato sostanziale nella selezione delle more. La maggior parte dei programmi di miglioramento genetico ha raggiunto grandi dimensioni nelle selezioni e/o nelle cultivar rilasciate. Pertanto, sebbene la dimensione del frutto sia ancora molto importante nell'allevamento, nelle linee parentali sono state raggiunte dimensioni eccellenti, quindi questa caratteristica oggi è molto più facile da raggiungere nella progenie rispetto agli anni passati (*Clark & Finn, 2008*).

- Cultivar senza spine. Questa caratteristica è oggetto di notevole attenzione da molti anni e il numero di cultivar senza spine è in aumento. Sono stati fatti molti progressi nella

selezione di cultivar e varietà senza spine e si prevede che in futuro una percentuale maggiore di nuove cultivar avrà questa caratteristica (Clark & Finn, 2008).

- Resistenza ai parassiti. Le more sono straordinariamente esenti da malattie gravi e problemi di insetti nocivi in gran parte del loro areale di coltivazione, esiste comunque una serie di specie di parassiti che influiscono sulla produzione di more. Negli ultimi anni sono stati compiuti alcuni progressi nella resistenza ai parassiti, mentre altre preoccupazioni non sono state affrontate o si profilano come potenziali problemi (Clark & Finn, 2008).

Il doppio fiore/rosetta (*Cercospora rubi* [G. Wint.] Plakidas) è una malattia grave nel sud-est degli Stati Uniti (Ellis et al., 1991). In generale le cultivar senza spine dell'Arkansas presentano resistenza alla doppia fioritura e questo ha consentito l'espansione della produzione nel sud degli Stati Uniti; le cultivar spinose mostrano tutte un certo grado di suscettibilità (Buckley et al., 1995).

La peronospora (*Peronospora sparsa* Berk.) può essere un problema in tutte le regioni, ma in particolare nei climi freschi e umidi simili a California e Nuova Zelanda e tuttora c'è molto da imparare riguardo alle fonti di resistenza a questa malattia (Clark & Finn, 2008).

I virus sono noti da tempo in *Rubus*; un certo numero di virus sono stati recentemente identificati come presenti specificamente in mora (Guzmán-Baeny, 2003; Martin et al., 2004). RBDV (*Raspberry Bushy Dwarf Virus*), una sfida di lunga data nel lampone rosso, è diventato un problema crescente in mora. La selezione per la resistenza al virus non è stata intrapresa in modo specifico, sebbene attività come testare i genitori utilizzati negli incroci e nelle selezioni prima del rilascio siano diventate routine (Clark & Finn, 2008).

- Adattamento ambientale, habitus vegetativo e periodo di fruttificazione e di maturazione.

In passato, l'adattamento ambientale delle more si è concentrato soprattutto sulla resistenza invernale. Moore (1984) infatti ha indicato che la mancanza di resistenza invernale era una delle principali limitazioni all'espansione della coltura (Clark & Finn, 2008). La produzione di more in ambienti a basse temperature (generalmente 300 ore o meno sotto i 7°C durante la stagione "dormiente") è notevolmente aumentata negli ultimi anni, soprattutto in Messico. In questi ambienti, grazie a tecniche colturali come la defogliazione, la potatura e le applicazioni di regolatori della crescita, è possibile forzare le piante a fiorire in tempi diversi, promuovendo anche l'aumento della produzione di frutti di elevate qualità (Clark & Finn, 2008).

Attualmente, la notevole espansione della coltura in diversi ambienti ha portato alla realizzazione di programmi di miglioramento genetico volti anche a ridurre il fabbisogno in freddo.

In base all'habitus vegetativo della pianta, le more vengono solitamente classificate in base al portamento dei tralci che può essere strisciante, semi-eretto ed eretto. Geneticamente esiste un continuum di tipi di tralci e non classi distinte come qui menzionato, che però risultano utili dal punto di vista pratico. Il miglioramento genetico e la selezione si occupano di tutte e tre le classi, in base alle specifiche esigenze di coltivazione.

Il tempo di maturazione dei frutti varia sostanzialmente ed è una caratteristica di primaria importanza per la maggior parte dei coltivatori di more. Nel miglioramento genetico del rovo la maturazione precoce è spesso una priorità così come la maturazione tardiva, necessarie per estendere la stagione di raccolta delle more.

- Carattere di rifiorenza. Lo sviluppo dei boccioli dei fiori e dei frutti sui polloni di un anno ha avuto un'importanza commerciale sostanziale nel lampone rosso. Questa abitudine alla fruttificazione ha recentemente attirato l'attenzione tra i coltivatori di more e nei prossimi anni le cultivar rifioventi diventeranno importanti nella produzione commerciale (Clark & Finn, 2008). Le fonti identificate per la caratteristica della rifiorenza per la mora includono il lampone rosso e la selezione di more selvatiche denominata 'Hillquist', nonché cultivar e selezioni con 'Hillquist' nel loro background genetico.

Secondo Lopez-Medina et al. (2000) la caratteristica di rifiorenza era un tratto recessivo. Da piantine prodotte dai programmi di incrocio di Lopez-Medina et al., sono stati rilasciati 'Prime-Jan' e 'Prime-Jim' (Clark et al., 2005).

Un altro sforzo sostanziale per avere la rifiorenza in mora è stato segnalato da Lim e Knight (2000). Il loro approccio consisteva nell'utilizzare la colchicina per raddoppiare il numero cromosomico dei lamponi rossi rifioventi, producendo piante tetraploidi che sono state poi incrociate con more 4x e 8x e bacche ibride 6x (Clark & Finn, 2008).

Molti credono che la caratteristica di rifiorenza abbia un grande potenziale per promuovere la produzione di more nel mondo. Questa caratteristica probabilmente riceverà notevole attenzione nei prossimi anni e potrebbe rivoluzionarne la produzione in tutto il mondo (Clark & Finn, 2014).

1.3.1 Il carattere della rifioritura

Il rovo in base all'epoca e al tipo di fruttificazione si distingue in due gruppi: unifero e rifiorante (Morgan Diemoz, 2013).

- Il rovo unifero ha un ciclo di produzione che avviene in due anni. Nel primo anno si ha l'accrescimento vegetativo dei polloni, che a partire dalla primavera del secondo anno diventano tralci fruttiferi dalla quale si origineranno ramificazioni laterali. La fruttificazione dei tralci fruttiferi avviene in estate in condizioni di giorno lungo; successivamente, in autunno/inverno i tralci fruttiferi seccano e verranno rimpiazzati da nuovi polloni durante la primavera (Figura 1a).

- Il rovo rifiorante ha anch'esso un ciclo di produzione che avviene in due anni, con la differenza, rispetto al rovo unifero, che i polloni possono fruttificare due volte; I polloni del primo anno possono fruttificare una prima volta nella parte apicale in autunno, ossia alla fine della stagione di crescita, ed una seconda volta durante l'estate del secondo anno, questa volta nella parte sottostante l'apice vegetativo (Figura 1b).

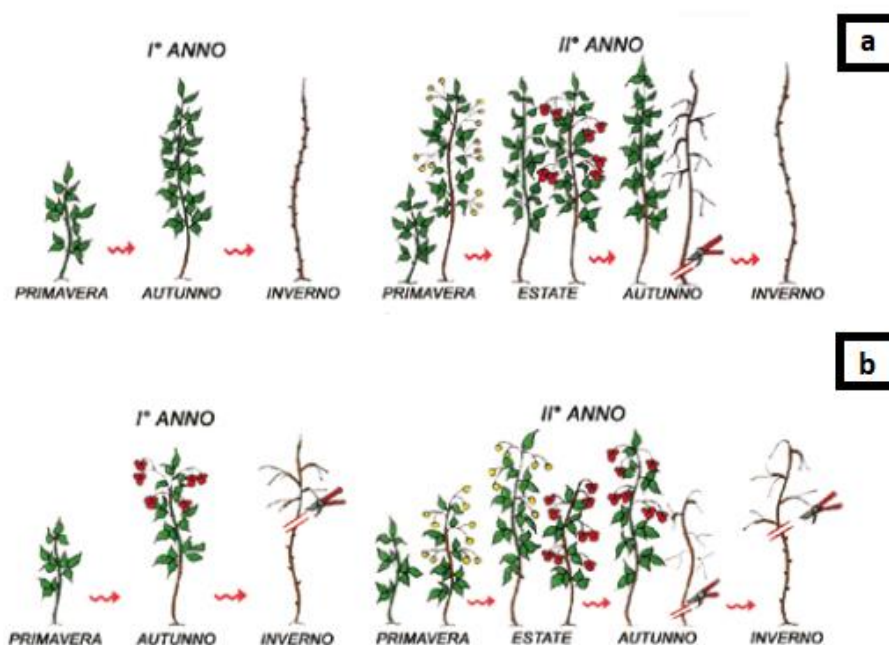


Figura 1: Ciclo biologico e fruttificazione nel rovo unifero (a) e nel rovo rifiorante (b). Immagine presa da Manuale tecnico-pratico 'La coltivazione del lampone', Morgan Diemoz.

Le varietà commerciali di rovo sono principalmente unifere e la fruttificazione dei tralci fruttiferi del secondo anno è stata la base di tutta la produzione di more. Il carattere

della rifioritura è presente in alcuni genotipi selvatici che mostrano una debole fruttificazione dei polloni del primo anno, questo è un carattere che è ben sviluppato nei lamponi ed è stato determinante nell'espansione dell'industria di questi ultimi, garantendone un notevole successo commerciale.

Le varietà di mora rifiorite sono molto limitate e poco diffuse a causa delle loro scarse caratteristiche produttive e qualitative; prima del rilascio di 'Prime-Jim' e 'Prime-Jan' da parte dell'Università dell'Arkansas nel 2004 (Clark *et al.*, 2005) non esistevano cultivar commerciali rifiorite di mora (Clark & Finn, 2014).

L'Università dell'Arkansas ha rilasciato la prima mora rifiorita commercialmente valida, 'APF-45' (commercializzata come 'Prime-Ark 45') (Clark & Perkins-Veazie, 2011), che ha avuto un notevole impatto sul mercato statunitense.

In futuro si prevede che l'industria coltiverà più varietà di rovo rifiorite e, man mano che verranno sviluppate cultivar migliorate che presentano il carattere della rifioritura, si prevede che avranno lo stesso tipo di impatto sulla produzione fresca che ha avuto il lampone rosso (Clark *et al.*, 2012).

Tramite le tecniche di miglioramento genetico tradizionale, in rovo, risulta molto difficile combinare il carattere della rifioritura con i caratteri produttivi e qualitativi; risulta interessante l'applicazione di nuove biotecnologie utili a modificare le caratteristiche vegeto-riproduttive delle varietà di mora unifere con le migliori caratteristiche produttive e qualitative.

Il valore del carattere della rifioritura dipende principalmente dall'ambiente di crescita e dalle opportunità di commercializzazione della frutta; ad esempio, un periodo molto importante in cui la disponibilità di frutti di mora è limitata negli Stati Uniti va da settembre a novembre, questo è anche un periodo di prezzi della frutta più alti e di potenziale redditività dei coltivatori (Carvalho *et al.*, 2010); la rifioritura in rovo sta iniziando a svolgere un ruolo nel riempire questa finestra di mercato (Clark & Finn, 2014).

Dato che i polloni (del primo anno) non hanno bisogno di svernare per poter fruttificare, esiste l'opportunità di coltivare il rovo in aree dove solitamente la coltura muore durante l'inverno. Nelle aree con raffreddamento inadeguato per le more unifere, il carattere della rifioritura ha un grande potenziale in quanto viene eliminata la necessità di accumulare ore di freddo; ciò, ad esempio, potrebbe essere particolarmente utile in Messico, dove sono necessarie manipolazioni chimiche delle piante sulle cultivar unifere (Clark & Finn, 2014).

Possiamo concludere dicendo che il carattere rifiorante è uno degli sviluppi più innovativi nella selezione delle more, che presenta diversi vantaggi tra cui:

- potenziale di due raccolti sulla stessa pianta nello stesso anno;
- fruttificazione in condizioni di giorno corto (autunno);
- la possibilità di programmare la produzione di frutta in base alla gestione dei polloni del primo anno;
- riduzione dei costi di potatura mediante lo sfalcio dei tralci fruttiferi (solo coltura di polloni del primo anno);
- prevenzione dei danni invernali;
- produzione di frutta in un'area geografica estesa (come ambienti poco freddi o non freddi).

1.4 Classificazione varietale di Loch Ness e Loch Tay

In Europa, e in particolar modo in Italia, sono oggetto di maggior interesse le cultivar inermi erette e semierette poichè facilitano le operazioni colturali e la raccolta.

Le nostre prove sperimentali sono state condotte sulle due cultivar ibride di mora Loch Ness e Loch Tay, ottenute da selezioni di *Rubus* in Scozia; entrambe sono accomunate dall'assenza di spine e dal portamento semi eretto, differendo però per l'epoca di maturazione. Di seguito vengono descritte brevemente le principali caratteristiche delle due cultivar oggetto di sperimentazione.

- **Loch Ness**: originaria del Regno Unito è una cultivar senza spine che presenta un portamento semi eretto. Produce frutti molto grandi che sono neri e lucidi. È caratterizzata da un'elevata produttività e predilige zone molto soleggiate. La cultivar è vigorosa, i suoi germogli sono lunghi, semi eretti e posso crescere fino a 3-4 m. È resistente al gelo. La cultivar è resistente a diverse malattie e in particolare alla botrite, all'oidio e alla ruggine, ma è vulnerabile alla peronospora in condizioni di elevato calore e umidità. Si adatta bene ai vari tipi di terreno. I frutti sono di media pezzatura a forma di cono; si conservano bene anche da congelati e per questo adatti al commercio. Le drupe maturano uniformemente e hanno spiccate proprietà organolettiche. I frutti vengono raccolti da fine luglio a settembre.
- **Loch Tay**: è anch'essa una cultivar ottenuta nel Regno Unito, è un arbusto rustico e vigoroso senza spine, con tralci molto lunghi che emettono polloni alla base e portamento semi eretto. Presenta un apparato radicale molto superficiale e fascicolato. Fiorisce in maggio-giugno e fruttifica precocemente (all'inizio di luglio), con grosse bacche ellittiche di colore rosso che diventano nere lucide a maturazione e di sapore dolce/acidulo. Predilige zone molte soleggiate ed è abbastanza resistente ai freddi invernali, alle brine tardive e a periodi di lunga siccità. Predilige terreni freschi, di medio impasto anche calcarei. Va irrigato regolarmente per ottenere delle buone fruttificazioni e non necessita di particolari concimazioni.

1.5 Il miglioramento genetico tramite le biotecnologie

La selezione convenzionale nelle specie legnose è limitata da numerosi vincoli, come l'alto livello di eterozigosi o la mancanza di donatori naturali dei tratti desiderati (*Flachowsky et al., 2009*).

Il miglioramento genetico nelle specie del genere *Rubus* risulta ancora oggi complicato, infatti, i selezionatori devono affrontare numerose sfide, come la poliploidia, la mancanza di diversità genetica in molte cultivar d'élite e, fino a poco tempo fa, la relativa carenza di risorse genetiche e genomiche disponibili per *Rubus* (*Foster et al., 2019*).

Un'alternativa alla selezione classica è l'utilizzo di tecniche di ingegneria genetica; queste consentono l'introduzione di nuove caratteristiche da un organismo ad un altro per un miglioramento significativo rispetto alle caratteristiche precedentemente esistenti ed un maggiore controllo su tali caratteristiche, rispetto ai metodi precedenti come la selezione classica e la mutagenesi (*Lawlor, 2013*).

La modificazione genetica è l'area della biotecnologia che si occupa della manipolazione del DNA negli organismi viventi, consentendo loro di svolgere funzioni specifiche (*Zhang et al., 2016*).

Mediante le modificazioni genetiche si possono creare organismi geneticamente modificati (OGM) che sono organismi (pianta, animale o microrganismo) il cui materiale genetico è stato alterato utilizzando tecniche genetiche o cellulari della moderna biotecnologia (*Ssekyewa & Muwanga, 2009*).

La trasformazione genetica di un organismo ci permette di: accelerare il processo di miglioramento genetico, aumentare il pool genetico (possono essere utilizzati geni da qualsiasi regno) ed infine di studiare l'espressione genica.

La manipolazione del genoma dell'organismo viene effettuata sia attraverso l'introduzione di uno o più nuovi geni ed elementi regolatori, sia diminuendo o bloccando l'espressione di geni endogeni attraverso la ricombinazione di geni ed elementi regolatori (*Bazanperegrine et al., 2013*).

I geni utilizzati nella trasformazione genetica possono appartenere principalmente a due categorie:

1. Cisgeni: se il gene inserito nella cellula target appartiene al pool genetico di piante che sono interfertili con la pianta target;
2. Transgeni: se il gene inserito nella cellula target è un gene esogeno derivante da una specie diversa e non interfertile da quella target.

Possiamo distinguere quattro tipi di geni impiegati nella trasformazione genetica delle piante:

- **Geni marcatori:** Conferiscono un vantaggio selettivo alle cellule transgeniche, fanno sì che queste crescano in condizioni non vitali per analoghe cellule non transgeniche, ad esempio, conferendo resistenza ad antibiotici o a erbicidi. Nelle nostre prove sperimentali il gene marcatore da noi utilizzato è stato *NPTII*, che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina.

- **Geni reporter:** conferiscono un particolare fenotipo alle cellule transgeniche, per far sì che esse vengano evidenziate tra le analoghe cellule non transgeniche. I geni reporter più utilizzati sono GUS che codifica per l'enzima B-glucuronidasi e GFP che codifica per la green fluorescent protein; quest'ultimo agevola l'individuazione e la selezione delle cellule trasformate durante le nostre prove sperimentali.

- **Geni regolatori (promotori):** costituiti da specifiche sequenze di DNA alla quale si lega la RNA polimerasi per iniziare la trascrizione di uno o più geni; questi possono essere di tre tipi: costitutivi, sito specifici e indotti da stress. Il promotore costitutivo 35S, presente nel costrutto genico delle nostre sperimentazioni, è un promotore che assicura elevati livelli di espressione del gene in tutta la pianta.

- **Geni utili:** conferiscono un carattere e quindi un fenotipo di interesse economico/ecologico alle piante modificate. Il gene *FveFT2*, gene d'interesse con cui abbiamo condotto la prova di trasformazione genetica, è un gene isolato da *F. vesca* e responsabile della rifioritura in fragola.

I fattori che influenzano la reale possibilità d'applicazione della trasformazione genica sono essenzialmente: la disponibilità della sequenza del gene d'interesse, la tecnica di trasferimento del gene nella cellula vegetale, la tecnica di rigenerazione che deve essere particolarmente efficiente e la selezione degli individui trasformati.

Il processo di organogenesi da tessuti somatici in *Rubus* non risulta così efficiente, ed è fortemente influenzato dal genotipo. Infatti, le diverse cultivar o varietà presentano una diversa efficienza di rigenerazione come anche una diversa sensibilità agli antibiotici presenti nei terreni di selezione/ rigenerazione (*Fiola et al., 1990; Hassan et al., 1993; De faria et. al 1997; McNicol & Graham, 1999; Georgieva et al., 2008; Gajdošová et al., 2015; Súkeniková et al., 2015*).

La trasformazione genetica in *Rubus* legnoso spp. è stato studiato da diversi autori (*Graham & McNicol, 1990; Fiola et al., 1990; Hassan et al., 1993; Mathews et al., 1995; De Faria et al. 1997; Mezzetti et al., 2004; Georgieva et al., 2008*). A dispetto di qualche risultato parziale,

l'effettiva rigenerazione delle piante transgeniche è notevolmente limitata a pochi genotipi di lampone e di mora ibrida (Finn & Hancock, 2008; Aldwinckle & Malnoy, 2009) e secondo altri autori (Finn 2008; Clark & Finn 2011) le more transgeniche sono state prodotte fino ad oggi utilizzando espianti di piante mature allevate *in vitro* (M. Súkeníková et al., 2015).

1.5.1 Il gene di interesse *FveFT2*

In molte specie vegetali, il segnale principale che controlla il processo di induzione a fiore, cioè la transizione del meristema dallo stato vegetativo a quello riproduttivo, è la variazione stagionale della durata del giorno (McGarry & Ayre, 2012).

La fioritura è indotta dalla riduzione della luce diurna nelle specie brevidiurne o a giorno corto o dall'aumento della luce diurna nelle specie longidiurne o a giorno lungo; *Rubus fruticosus* L. rientra in quest'ultima categoria.

Ci sono poi specie che sono insensibili al fotoperiodo, nella quale la fioritura non è regolata da variazioni stagionali della durata del giorno, queste ultime sono chiamate neutro diurne o riflorenti; l'insensibilità al fotoperiodo in diverse specie vegetali è stata cruciale per estendere il loro areale di coltivazione e/o la durata del periodo di produzione (Soyk et al., 2017; Denoyes et al., 2020).

In natura, la maggior parte delle fragole sono piante brevidiurne, in cui l'induzione a fiore avviene in condizioni di giorno corto, quando la temperatura e la durata del giorno diminuiscono (Stewart & Folta, 2010; Heide et al., 2013).

F. vesca, la fragola diploide di bosco, a differenza della maggior parte delle fragole coltivate, è neutro diurna, presentando il vantaggio della rifioritura e quindi della limitazione all'induzione a fiore delle gemme dovuta soltanto alla temperatura e non più al fotoperiodo.

Negli ultimi anni, ricerche approfondite hanno evidenziato il ruolo dei membri della famiglia CENTRORADIALIS/TERMINAL FLOWER 1/SELF-PRUNING (CETS) nell'attivazione o nella repressione della fioritura (Wickland & Hanzawa, 2015).

Tra le proteine CETS, le proteine FT che sono espresse nelle foglie in condizioni di induzione a fiore e che si spostano attraverso il floema fino al meristema apicale in cui promuovono la fioritura, sono state identificate come florigene (attivatori florigeni mobili) (Lifschitz et al., 2006; Corbesier et al., 2007; Tamaki et al., 2007; Wickland & Hanzawa, 2015). Le proteine TFL1 sono i principali repressori floreali che mantengono l'indeterminazione del meristema (Périlleux et al., 2019).

L'equilibrio FT/TFL1 gioca quindi un ruolo chiave nel modello di formazione delle strutture vegetative e riproduttive e ha un impatto considerevole sull'architettura e sulla resa delle piante (Shalit et al., 2009; Lifschitz et al., 2014; Park et al., 2014; Moraes et al., 2019).

Il ruolo delle proteine FT come florigene, cioè responsabili di un segnale mobile prodotto nella foglia e trasmesso al meristema apicale dove inizia la fioritura, è stato confermato in un numero considerevole di specie vegetali (Pin & Nilsson, 2012; Wickland & Hanzawa, 2015).

Le proteine FT in *F. vesca* studiate sono:

- *FveFT1*: è un attivatore dell'induzione a fiore in specie longidiurne (Rantanen et al., 2014);
- *FveFT2*: è un attivatore, a lungo ricercato, dell'induzione a fiore in specie neutrodiurne e che consente la fioritura in specie di fragola brevidiurne (Gaston et al., 2021);
- *FveFT3*: strettamente correlato a *FveFT2* e che modula la ramificazione, il numero dei fiori e la resa dei frutti (Gaston et al., 2021).

In uno studio di Gaston et al. (2021) è stato dimostrato come *FveFT2* si è rivelato in gran parte insensibile al fotoperiodo e quindi l'unico FT ad essere responsabile della fioritura precoce in fragola e quindi della rifioritura.

Mentre *FveFT1* è un florigene fotoperiodico come i geni canonici FT, *FveFT2* assomiglia ai florigeni FT non fotoperiodici precedentemente identificati in specie vegetali neutrodiurne, ad esempio il gene *SFT* nel pomodoro e il gene *StSP3D* nella patata (Lifschitz & Eshed, 2006; Navarro et al., 2011).

Le scoperte su *F. vesca* possono essere tradotte nella fragola coltivata in cui la sovraespressione del florigene non fotoperiodico *FveFT2*, mediato da *A. tumefaciens* grazie al costrutto 35S::FveFT2 Fa0E, ha fatto avanzare notevolmente la precocità della fioritura e un aumento della produzione di fiori in *F. x ananassa* cv. 'Sveva' (a fioritura stagionale) (Gaston et al., 2021).

1.5.2 Trasferimento del gene di interesse

Esistono diverse tecniche per la trasformazione genetica delle piante. La trasformazione genetica classica di un vegetale può avvenire sia per metodi diretti, dove il DNA esogeno viene inserito direttamente nella cellula come ad esempio con l'elettroporazione di protoplasti, con la microiniezione di DNA, o con il metodo biolistico, sia per metodi indiretti quindi tramite agenti patogeni batterici e virali come ad esempio il trasferimento mediato da *Agrobacterium tumefaciens*, metodo attraverso il quale sono state condotte le nostre prove sperimentali.

Troviamo in letteratura trasformazioni genetiche in *Rubus* con riferimenti sia al trasferimento di geni mediato da *A. tumefaciens* sia all'elettroporazione di protoplasti.

1.5.1.1 Trasferimento del gene di interesse mediato da *A. tumefaciens*

Il trasferimento ad una pianta di geni di interesse specifici utilizzando *A. tumefaciens* come vettore è basato sulla capacità di quest'ultimo di introdurre nel genoma di una cellula vegetale una breve sequenza di DNA plasmidico, il T-DNA. *A. tumefaciens* è un batterio gram negativo che in natura è capace di infettare diverse specie di piante, principalmente le dicotiledoni. La malattia causata dal processo d'infezione è nota come galla o tumore del colletto.

L'infezione avviene grazie ad un plasmide extracromosomico posseduto dall'agrobatterio, il plasmide-Ti (Tumor Inducing) (Figura 2), che codifica sia per il T-DNA sia per i geni necessari a trasferirlo nella cellula vegetale.

Il plasmide-Ti contenuto in *A. tumefaciens* è composto dalla porzione di T-DNA delimitata da left border (LB) e right border (RB) e dalla regione dei geni *vir* responsabili del trasferimento del T-DNA all'interno della cellula vegetale.

In natura *A. tumefaciens* tramite il plasmide-Ti, trasferisce nel genoma della pianta delle sequenze che codificano per l'induzione di iperplasie e neoplasie a livello dei tessuti.

L'agrobatterio può penetrare nel tessuto vegetale grazie a ferite o tagli presenti sulla superficie di quest'ultima che rilascia dei composti fenolici che si comportano da attrattori per *A. tumefaciens*. I composti fenolici legano alcuni recettori batterici di superficie che scatenano una trasduzione del segnale con fosforilazione di una proteina, la quale induce poi la trascrizione dei geni *Vir*.

I geni *Vir*, fondamentali per il processo infettivo e per il conseguente trasferimento del T-DNA, codificano per le omonime proteine, tra le quali distinguiamo:

- VirD che è responsabile del doppio taglio del DNA in corrispondenza di due siti del plasmide Ti che indurrà il tumore, da quest'ultimo si stacca un frammento di T-DNA a singola elica;
- Vir E che protegge il singolo filamento di T-DNA dalla degradazione;
- Vir B che forma un canale tra la cellula batterica e quella vegetale mettendo in collegamento le rispettive membrane.

Avvenuto il trasferimento del T-DNA batterico al citoplasma della cellula vegetale, questo entra nel nucleo e si integra al genoma vegetale.

L'integrazione del T-DNA nei cromosomi è specifica ed avviene in prossimità delle opine, geni che regolano particolari fattori di crescita delle cellule.

Manipolando il genoma del batterio, è stato possibile eliminare, all'interno del plasmide-T, le regioni responsabili dell'induzione di tumori e rimpiazzarle con il segmento di DNA di interesse (Figura 2), trasferendo così quest'ultimo pur conservando le caratteristiche di virulenza.

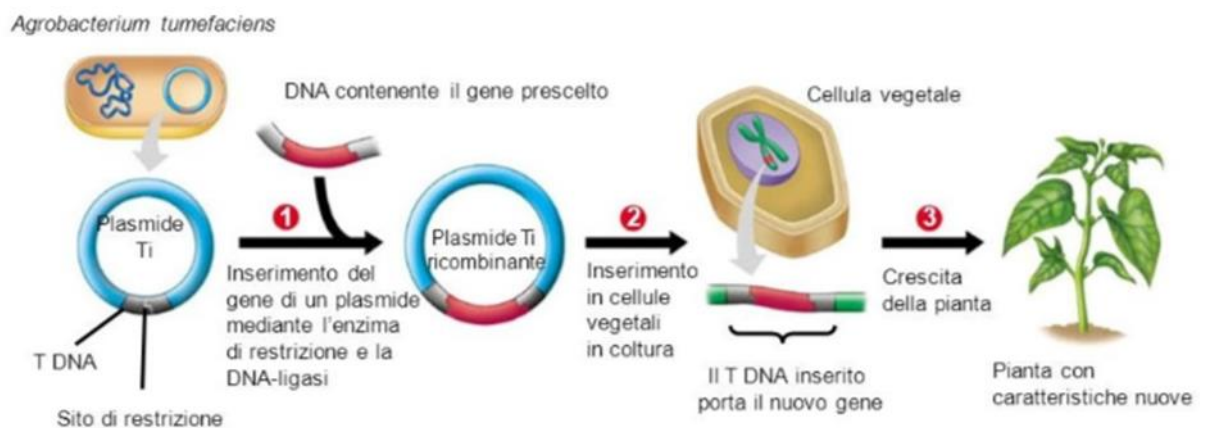


Figura 2: Trasformazione genetica della pianta mediata da *A. tumefaciens*. Immagine presa da <https://slideplayer.it/slide/954101/>.

La tecnologia del DNA ricombinante è la tecnica utilizzata nell'ingegneria genetica che prevede l'identificazione, l'isolamento e l'inserimento del gene di interesse in un vettore, come in questo caso di un plasmide, per formare una molecola di DNA ricombinante; questa biotecnologia prevede l'inserimento di frammenti di DNA provenienti da una varietà di fonti, aventi una sequenza genetica desiderabile tramite un vettore appropriato (*Berk & Zipursky, 2000*).

Il termine DNA ricombinante indica una molecola di DNA formata in laboratorio unendo insieme sequenze di DNA provenienti da diverse fonti biologiche. Tali molecole di DNA ricombinante sono creazioni artificiali di laboratorio e non si trovano in natura (*Temesgen Begna, 2020*). La molecola di DNA ricombinante viene costituita servendosi di endonucleasi di restrizione per i siti di DNA di sequenze bersaglio specifiche e di DNA ligasi per unire i frammenti e fissare il gene desiderato nel vettore.

Il potere della tecnologia del DNA ricombinante è sorprendente, poiché consente ai genetisti di identificare e isolare un singolo gene o segmento di DNA di interesse tra le migliaia o decine di migliaia presenti in un genoma (Klug et al., 2009).

L'incorporazione di DNA esogeno nelle colture mediata da *A. tumefaciens* è una tecnica promettente di trasformazione genetica, che richiede una corretta rigenerazione delle piante dalle cellule trasformate (Figura 2). Anche se il corretto sistema di rigenerazione esiste già per alcune specie, è noto che lo stato transgenico delle cellule potrebbe avere effetti negativi sulla rigenerazione stessa (Gajdošová et al., 2015).

Il processo di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* comprende sostanzialmente le seguenti fasi (Figura 3):

- 1) ricerca e isolamento del gene d'interesse;
- 2) preparazione del costrutto genico e inserimento all'interno dell'agrobatterio;
- 3) protocollo efficiente di rigenerazione del materiale vegetale potenzialmente trasformato;
- 4) infezione con agrobatterio degli espianti vegetali;
- 5) selezione del materiale vegetale geneticamente modificato;
- 6) acclimatamento delle piante geneticamente modificate.

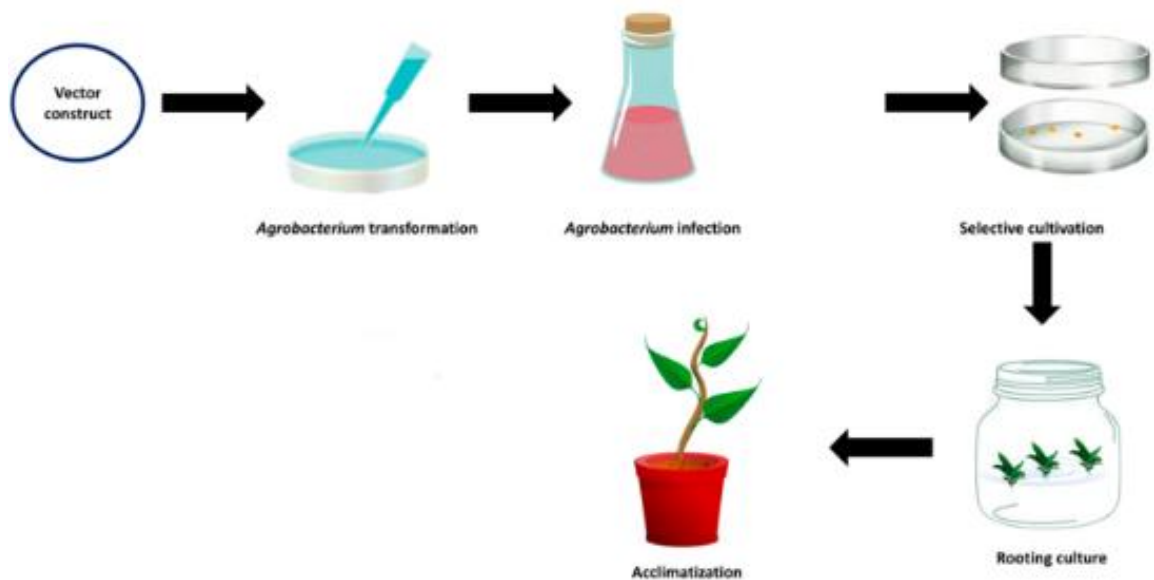


Figura 3: Principali fasi del processo di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*. Immagine presa da "Recent Progress in the Regeneration and Genetic Transformation System of Cucumber".

L'utilizzo della tecnologia del DNA ricombinante nel genere *Rubus* è stata studiata e applicata da diversi ricercatori e la maggior parte dell'innovazione è avvenuta con il lampone rosso (Clark et al., 2007).

Alcuni dei primi studi furono condotti da McNicol e Graham (1989; 1992) e Graham e McNicol (1990), che trasferirono con successo il gene inibitore della tripsina del fagiolo dall'occhio (*Vigna unguiculata* L.) in *Rubus* mediante *Agrobacterium tumefaciens* e del vettore binario PBI121.X, che trasferì il marcatore della beta-glucuronidasi (GUS), quest'ultimo utilizzato per confermare il trasferimento del gene nelle piante geneticamente trasformate (Clark et al., 2007).

Mathews et al. (1995) trasferirono nel lampone il gene della s-adenosilmetionina idrolasi, che può ridurre la produzione di etilene della pianta (Clark et al., 2007).

Kokko & Karenlapi (1998) hanno trasformato il rovo artico (*R. arcticus* L.) con l'agrobatterio (Clark et al., 2007).

Mezzetti et al. (2002, 2004) ha prodotto il primo clone di lampone geneticamente modificato con il gene *DefH9-iaaM* che promuove la sintesi di auxina e conferisce lo sviluppo dei frutti partenocarpici. La sintesi endogena di auxina causata dal gene è stata in grado di sostenere lo sviluppo del frutto partenocarpico dai fiori evirati del clone geneticamente modificato 'Ruby' *R. idaeus*.

Gli esperimenti di trasformazione sono stati condotti utilizzando l'*Agrobacterium tumefaciens* ceppo GV2260 portante il plasmide binario pBin19, contenente il gene partenocarpico (Rotino et al., 1997).

Le piante transgeniche oltre ad aver aumentato il numero di fiori per infiorescenza e aver sviluppato più infiorescenze per pianta, hanno aumentato significativamente il numero, le dimensioni e il peso dei frutti quando coltivate in condizioni di campo (Clark et al., 2007).

I ricercatori hanno concluso che il gene *DefH9-iaaM* aumenta il contenuto di auxina nei giovani boccioli dei fiori e promuove la partenocarpia nei fiori evirati.

Gajdošová et al. (2015) e M. Súkeniková et al. (2015) hanno condotto, su due cultivar di mora, prove sperimentali di trasferimento genico mediato da agrobatterio, ottenendo risultati parziali. I ceppi di agrobatterio utilizzati sono stati LBA4404, C58 e AGL0, mentre i plasmidi utilizzati per il trasferimento genico sono stati pTS2 e pCambia 1304.

1.5.1.2 Trasformazione genetica tramite fusione protoplastica

La biotecnologia nota come fusione protoplastica, chiamata anche ibridazione somatica, è una modificazione genetica delle piante in cui due specie vegetali vengono fuse in una pianta ibrida (ibrido somatico) che possiede i tratti di entrambe le specie.

La fusione di protoplasti è un fenomeno naturale che avviene quando due o più protoplasti entrano in contatto tra loro, da soli o quando sono in contatto con sostanze chimiche che inducono la fusione. Dopo l'adesione, le membrane dei protoplasti si uniscono fondendo così il loro citoplasma.

Possiamo in generale distinguere due tipi di fusione dei protoplasti, la fusione spontanea (molto limitata e di scarso o nullo interesse genetico) e la fusione indotta.

La fusione di protoplasti, liberi e isolati da varie fonti, spesso non può avvenire a causa del fatto che la superficie del protoplasto isolato ha una carica negativa attorno all'esterno della membrana plasmatica, causando un respingimento tra gli stessi. Per ovviare a questo problema la fusione di protoplasti può essere indotta mediante metodi chimici (impiego di un fusogeno, ad esempio il PEG) o metodi fisici (impiego di uno shock elettrico).

Phan et al. (1997) e Mezzetti et al. (1999) hanno sviluppato protocolli efficienti per l'isolamento dei protoplasti e la rigenerazione delle piante di cultivar di lampone rosso 'Autumn Bliss' e mora 'Hull Thornless'. Mezzetti et al. (1999) ha fuso le sospensioni di protoplasti delle due cultivar con trattamento con polietilenglicole (Peg). Le linee di callo ibride risultanti sono state strutturalmente differenziate per la formazione delle radici e la crescita pre-embriale (Clark et al., 2007).

1.5.3 Rigenerazione delle cellule trasformate

La rigenerazione *in vitro* è una delle tecniche che si è rivelata importante per il miglioramento genetico delle colture e si basa sulla capacità di rigenerazione delle piante da cellule coltivate, tessuti e/o organi. Con questa tecnica è possibile lo sviluppo dei germogli o radici da cellule differenziate o indifferenziate da callo (Hicks, 1980).

L'incorporazione di DNA esogeno nelle colture mediante l'utilizzo di *Agrobacterium tumefaciens* è una promettente tecnica di trasformazione genetica, che richiede rigenerazione vegetale di successo da cellule trasformate (Gajdošová et al., 2015).

Per la trasformazione genetica nelle specie vegetali legnose, è preferibile la rigenerazione a partire da tessuti somatici.

Nella rigenerazione avventizia di *Rubus* riportata da altri autori, le foglie sono per lo più usate come espianti iniziali (Swartz et al., 1990; Turk et al., 1994; Tsao & Reed, 2002; Zawadska & Orlikowska, 2006; Lazić & Ružić, 2007; Gupta & Mahalaxmi, 2009; Vujović et al., 2010; Gajdošová et al., 2015; Súkeníková et al., 2015). Meng et al., (2004) ha utilizzato foglie e piccioli come espianti primari nella rigenerazione delle more. Nelle nostre prove abbiamo utilizzato foglia e picciolo come espianti di partenza per la trasformazione genetica e la successiva rigenerazione.

In vitro l'organogenesi avventizia è stata studiata in diversi genotipi di *Rubus* (Graham et al., 1997; Mezzetti et al., 1997; Palonen e Buzard, 1998; Tsao e Reed, 2002; Meng et al., 2004; Zawadska e Orlikowska, 2006; Lazić e Ružić, 2007; Gupta e Mahalaxmi, 2009; Vujović et al., 2010). I risultati di questi studi hanno dimostrato che lo sviluppo di un efficiente sistema di rigenerazione è complicato in queste specie a causa dell'elevata diversità genotipica presente nel genere *Rubus*, e della difficoltà a rigenerare le piante da tessuto derivato da piante mature.

È noto che per indurre la formazione di germogli si deve aumentare il rapporto citochinine-auxine del terreno di coltura. Il Thidiazuron (TDZ), una citochinina di sintesi, è stato utilizzato nei terreni di rigenerazione delle nostre prove sperimentali.

I terreni di rigenerazione utilizzati durante le nostre prove sperimentali con Loch Ness e Loch Tay sono genotipo specifici e sono stati ottimizzati precedentemente nel nostro laboratorio.

Nella mora, l'incubazione al buio di espianti fogliari per almeno una settimana è necessaria per migliorare l'organogenesi (Zakaria et al., 2014). L'incubazione al buio è consigliata per ridurre la necrosi degli espianti, inibendo l'attività enzimatica che è responsabile dell'ossidazione dei tessuti.

Il terreno di rigenerazione delle cellule trasformate deve essere inteso anche come un terreno di selezione, tale da favorire la rigenerazione delle cellule trasformate a discapito di quelle che non hanno subito trasformazione. Per permettere la selezione all'interno del terreno di rigenerazione vengono solitamente utilizzati antibiotici, la kanamicina nelle nostre prove sperimentali, alla quale le cellule trasformate sono resistenti grazie al gene di resistenza presente all'interno del DNA ricombinato, nel nostro caso il gene *NPTII*.

All'interno del terreno di selezione devono essere presenti anche uno o più antibiotici di "decontaminazione", capaci di impedire lo sviluppo di *A. tumefaciens* sul terreno ed evitare quindi contaminazioni. Nelle nostre prove sperimentali abbiamo testato singolarmente tre diversi antibiotici di decontaminazione, il cefotaxime, la timentina e la carbenicillina.

È noto che l'applicazione delle tecniche di trasformazione genetica è fortemente dipendente da un efficiente sistema di rigenerazione dell'impianto.

Nonostante alcuni risultati parziali, l'effettiva rigenerazione delle piante transgeniche è ancora limitata, soprattutto a causa della notevole sensibilità dei loro tessuti agli antibiotici utilizzati per la selezione del tessuto trasformato che quindi influenzano negativamente il processo di rigenerazione (Fiola et al., 1990; Hassan et al., 1993; De Faria et al., 1997; Georgieva et al., 2008; Gajdošová et al., 2015; Súkeniková et al., 2015).

È stato osservato un forte effetto negativo della kanamicina sulla rigenerazione e sulla sopravvivenza dei germogli di *Rubus* da altri autori (Fiola et al., 1990; De Faria et al., 1997; Graham e McNicol, 1990; Hassan et al., 1993; Gajdošová et al., 2015).

La trasformazione genetica in *Rubus* si è rivelata problematica sia a causa dello sviluppo di efficienti sistemi di rigenerazione, che sono altamente genotipo specifici e sia a causa degli antibiotici comunemente utilizzati come ad esempio la kanamicina per selezionare i tessuti transgenici e il cefotaxime o la carbenicillina per fermare l'ulteriore crescita di *A. tumefaciens* sugli espianti (McNicol & Graham, 1990). Risulta quindi necessaria l'elaborazione di un efficiente protocollo di rigenerazione degli espianti vegetali trasformati.

2 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro sperimentale riportato nella seguente tesi ha avuto come obiettivo l'ottimizzazione della trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* per il carattere responsabile della rifiorescenza in fragola (*FveFT2*) in due cultivar di mora di interesse commerciale, Loch Ness e Loch Tay.

Il lavoro di tesi si articola in tre diverse sperimentazioni eseguite sulle due cultivar sopracitate, utilizzando foglie e piccioli come espianti di partenza.

Nella prima prova sperimentale è stato condotto un test di tossicità ad antibiotici di decontaminazione comunemente utilizzati per contenere la crescita dell'agrobatterio in fase di post-infezione nei terreni di selezione/rigenerazione. Gli antibiotici testati sono stati il cefotaxime, la carbenicillina e la timentina; il test ha avuto lo scopo di verificare quali di questi antibiotici non influiscono negativamente sulla rigenerazione, permettendoci di selezionare il più idoneo per la prova di trasformazione, in base alla cultivar e alla tipologia di espianto utilizzati.

La seconda sperimentazione ha riguardato anch'essa un test di tossicità ad un antibiotico, la kanamicina, necessario per la selezione del materiale vegetale trasformato geneticamente nei terreni di selezione/rigenerazione; sono state testate differenti concentrazioni dell'antibiotico al fine di determinarne quella più idonea, a seconda della cultivar e della tipologia di espianto, per selezionare il materiale vegetale trasformato all'interno del substrato di coltura.

Infine, è stata condotta una prova di trasformazione genetica sugli espianti vegetali delle due cultivar oggetto di sperimentazione; la trasformazione è stata condotta utilizzando *A. tumefaciens* come vettore del gene d'interesse *FveFT2*, gene responsabile del carattere rifioerente in fragola. La sperimentazione è stata condotta con il fine specifico di individuare quale tipologia di espianto e quale cultivar fosse più promettente per la trasformazione genetica, valutando l'espressione di GFP negli espianti vegetali.

In questa prova di trasformazione gli antibiotici utilizzati nel terreno di selezione/rigenerazione sono stati selezionati in base ai risultati osservati nei precedenti test di tossicità. La combinazione tra antibiotico di selezione e kanamicina e le relative

concentrazioni sono state differenti in base alla cultivar e alla tipologia di espianto utilizzata, queste sono state: per foglia di Loch Tay, carbenicillina 300 mg L^{-1} e kanamicina 10 mg L^{-1} ; per picciolo di Loch Tay, cefotaxime 200 mg L^{-1} e kanamicina 10 mg L^{-1} ; per foglia di Loch Ness carbenicillina 200 mg L^{-1} e kanamicina 25 mg L^{-1} ; per picciolo di Loch Ness, timentina 300 mg L^{-1} e kanamicina 25 mg L^{-1} .

3 MATERIALI E METODI

Le seguenti prove sperimentali sono state condotte presso il laboratorio di Biotecnologie Vegetali del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche.

Le prove sono state condotte su due diversi genotipi di mora (*Rubus fruticosus* L.), Loch Ness e Loch Tay.

Prima di procedere con la trasformazione genetica mediata da agrobatterio, sono stati condotti test di tossicità con diversi antibiotici, al fine di determinare quali di essi fossero i più idonei da utilizzare nel terreno di selezione/rigenerazione in seguito all' infezione con *A. tumefaciens*.

Gli antibiotici testati a differenti concentrazioni sono stati i seguenti: cefotaxime, timentina, carbenicillina e kanamicina. Quest'ultima è un antibiotico che funge da marcatore di selezione, favorendo lo sviluppo delle cellule trasformate rispetto a quelle non trasformate, infatti, le prime acquisiscono la resistenza all'antibiotico grazie al gene *Neomycin phosphotransferase II (NPTII)* contenuto all'interno del costrutto genico trasferitogli mediante l'agrobatterio. Il cefotaxime, la timentina e la carbenicilina sono antibiotici con un ruolo differente rispetto alla kanamicina, questi infatti sono comunemente utilizzati per contenere lo sviluppo di *A. tumefaciens* (e quindi di potenziali contaminazioni) all'interno dei terreni di coltura utilizzati per la rigenerazione degli espianti trasformati.

Successivamente ai test di tossicità agli antibiotici sono state condotte due prove di trasformazione mediate da *A. tumefaciens* su entrambi i genotipi, utilizzando per la selezione/rigenerazione i terreni di coltura ottimizzati in precedenza.

3.1 Preparazione degli espianti e dei terreni di coltura per le prove di tossicità

Nei test di tossicità e nelle prove di trasformazione genetica sono state utilizzate due tipologie di espianto, il picciolo e la foglia.

Mediante l'utilizzo di bisturi e pinze sterili sono stati prelevati germogli in allungamento delle due varietà di mora dai rispettivi vasi di crescita, composti da substrato MS di base (Murashige and Skoog, 1962) con vitamine incluse (Duchefa), 30 g L⁻¹ di saccarosio e 6 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa), arricchiti con 0,5 mg L⁻¹ di BAP e 0,2 mg L⁻¹ di GA₃ (Sigma-Aldrich), successivamente si è proceduto con la divisione dei piccioli dalle foglie, l'operazione è stata effettuata sotto cappa al fine di evitare contaminazioni.

I piccioli sono stati posizionati orizzontalmente sul terreno di rigenerazione immergendoli parzialmente, mentre le foglie sono state incise nella parte abassiale con 3-4 tagli trasversali lungo la nervatura centrale per essere poi posizionate con la pagina inferiore a contatto con il terreno di rigenerazione nelle piastre Petri.

Gli espianti vegetali, dopo essere stati posizionati nei diversi terreni all'interno di piastre Petri sterili, sono stati conservati al buio a 25°C per una settimana e successivamente esposti a luce diretta in camera di crescita per 38 giorni (fotoperiodo di 16-h ad un'intensità luminosa di 70 μmol/s).

Per la preparazione dei terreni impiegati nelle prove di tossicità ci siamo avvalsi del procedimento spiegato qui di seguito. In un cilindro graduato riempito con acqua Milli-Q sono stati aggiunti 4,4 g L⁻¹ di substrato Murashige and Skoog (MS) di base con vitamine incluse (Duchefa) (Murashige and Skoog, 1962), 20 g L⁻¹ di saccarosio e 7 g L⁻¹ di plant agar (Duchefa). Di seguito, tramite una micropipetta graduata, è stato aggiunto 5 mg L⁻¹ di tidiazuron (TDZ) per Loch Ness e 1 mg L⁻¹ di TDZ per Loch Tay (Tabella 1).

Dopo aver aggiunto il TDZ, il pH è stato portato intorno a valori di 5.7- 5.8.

Successivamente i terreni hanno subito un ciclo di sterilizzazione in autoclave a 121°C per 20 minuti alla pressione di 1,4 bar. Una volta raffreddati a circa 50°C, a quest'ultimi sotto cappa a flusso laminare sono stati aggiunte le diverse concentrazioni di antibiotici; infine sono stati colati circa 25 mL di terreno in piastre Petri sterili (9 cm × 1.5 cm).

Ogni piastra Petri rappresenta una replica al cui interno, una volta solidificato il terreno, sono stati posizionati 10 espianti rappresentanti le unità sperimentali.

Tabella 1: composizione iniziale dei terreni di selezione/rigenerazione per i due differenti genotipi, ai quali in seguito andranno aggiunti gli antibiotici.

	Loch Ness	Loch Tay
Sali	MS 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹
Carboidrati	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹
Regolatori di crescita	TDZ 5 mg L ⁻¹	TDZ 1 mg L ⁻¹
Agar	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹
pH	5.7 - 5.8	5.7 - 5.8

3.2 Test di tossicità agli antibiotici

I terreni di coltura utilizzati per i test di tossicità presentano differenze nella loro composizione soltanto per la concentrazione di TDZ (1 mg L⁻¹ per Loch Tay e 5 mg L⁻¹ per Loch Ness) in base al protocollo di rigenerazione precedentemente ottimizzato per i due genotipi in questo laboratorio.

I dati riguardanti l'efficienza di rigenerazione sono stati raccolti avvalendosi di un microscopio ottico dopo 45 giorni dall'inizio dell'esperimento. L'efficienza di rigenerazione è stata valutata considerando sia la frequenza di rigenerazione degli espianti calcolata come (numero di espianti che rigenerano almeno un germoglio/espianti totali)×100, sia il numero medio di germogli originatisi da un singolo espianto.

3.2.1 Test di tossicità a cefotaxime, carbenicillina e timentina

Sono stati condotti test di tossicità con tre diversi antibiotici (testati a diverse concentrazioni) comunemente usati per contenere lo sviluppo dell'*Agrobacterium tumefaciens* nei terreni di selezione/rigenerazione, per valutarne l'effetto sull'efficienza di rigenerazione. I test di tossicità sono stati condotti su entrambi i genotipi e su entrambe le tipologie di espianto.

Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: cefotaxime, carbenicillina e timentina.

I test di tossicità sono stati condotti separatamente per ogni antibiotico, utilizzando due diverse concentrazioni, 200 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹.

Per ogni combinazione tra genotipo, tipologia di espianto e concentrazione dell'antibiotico, sono stati testati 50 espianti suddivisi in 5 repliche a loro volta composte da 10 unità sperimentali. Il test è stato ripetuto due volte.

Si riportano qui di seguito la preparazione e la modalità di conservazione delle soluzioni stock degli antibiotici utilizzati nei test di tossicità.

- Cefotaxime (100 mg mL⁻¹): la preparazione consiste nel disciogliere 1 g di polvere in 10 mL di acqua Milli-Q. È stato utilizzato un filtro sterile da 0.22 µm per filtrare la soluzione in falcon sterili da 15 mL. Lo stock così preparato, si può conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi;
- Carbencillina (100 mg mL⁻¹): la preparazione consiste nel disciogliere 1 g di polvere in 10 mL di acqua Milli-Q. È stato utilizzato un filtro sterile da 0.22 µm per filtrare la soluzione in falcon sterili da 15 mL. Lo stock così preparato, si può conservare a -20°C per un massimo di 6 mesi;
- Timentina (100 mg mL⁻¹): la preparazione consiste nel disciogliere 1 g di polvere in 10 mL di acqua Milli-Q. È stato utilizzato un filtro sterile da 0.22 µm per filtrare la soluzione in falcon sterili da 15 mL. Lo stock così preparato, si può conservare a -20°C per un massimo di 6 mesi;

3.2.2 Test di tossicità alla kanamicina

Nelle prove sono state confrontate diverse concentrazioni dell'antibiotico selettivo kanamicina, utilizzato con lo scopo di determinare la concentrazione più idonea da utilizzare nei terreni di selezione/rigenerazione nelle successive prove di trasformazione.

Anche queste prove sono state condotte su entrambi i genotipi e su entrambe le tipologie di espanto.

Le concentrazioni di kanamicina confrontate sono state le seguenti: 0 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 80 mg L⁻¹.

La preparazione della soluzione stock di kanamicina (50 mg mL⁻¹) consisteva nel disciogliere 500 mg di kanamicina monosolfato in polvere in 10 mL di acqua Milli-Q, utilizzando poi un filtro sterile da 0.22 µm per filtrare la soluzione in eppendorf sterili da 1,5 mL. Lo stock così preparato si è potuto conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi.

Per ogni concentrazione dell'antibiotico, tipologia di espanto e genotipo, sono state testate cinque repliche composte ognuna da dieci unità sperimentali (foglie o piccioli). Sono state eseguite complessivamente due prove sperimentali.

3.3 Prova di trasformazione

3.3.1 Costrutto genico

Per le prove di trasformazione di Loch Ness e Loch Tay è stato utilizzato *A. tumefaciens*, ceppo GV3101, contenente all'interno un costrutto (35S::FveFT2, Gaston et al., 2021) codificante per:

- il gene reporter codificante per la Green Fluorescent Protein (GFP), la cui espressione è posta sotto il controllo del promotore costitutivo 35S, isolato dal virus del mosaico del cavolfiore (CaMV);
- la resistenza all'antibiotico kanamicina grazie al gene *Neomycin phosphotransferase II* (*NPTII*), anch'esso posto sotto il controllo del promotore costitutivo 35S;
- il gene responsabile del carattere riflorente in fragola *FveFT2* isolato da *F. vesca*.

3.3.2 Crescita dell'*Agrobacterium tumefaciens*, infezione dei tessuti vegetali e co-coltura

Per prima cosa, *A. tumefaciens* contenente il costrutto di interesse è stato fatto crescere su LB solido con specifici antibiotici a 28° C per circa 48 ore (Figura 4a).

Il terreno di Luria Bertani (LB) è un terreno di coltura comunemente utilizzato per la crescita batterica ed è costituito da: 10 g L⁻¹ di triptone, 5 g L⁻¹ di estratto di lievito, 10 g L⁻¹ di NaCl e 7 g L⁻¹ di agar; il pH viene aggiustato a 7,2 con NaOH. Successivamente dopo aver autoclavato il terreno e averlo raffreddato fino ad una temperatura di circa 50°C, sono stati aggiunti i seguenti antibiotici: spectinomicina 100 mg L⁻¹, rifampicina 25 mg L⁻¹, cloramfenicolo 10 mg L⁻¹. L'agrobatterio trasformato per esprimere il vettore di interesse è in grado di sopravvivere in presenza di tali antibiotici: di conseguenza, le colonie cresciute sono quelle di nostro interesse.

La fase successiva prevedeva l'inoculo di una singola colonia batterica all'interno di una falcon da 50 ml contenente 10 mL di LB liquido con l'aggiunta degli antibiotici di resistenza.

I batteri sono stati fatti crescere a 28° C per tutta la notte in agitazione (170 rpm) fino al raggiungimento di un O.D. (Optical Density), cioè l'assorbanza della soluzione ad una lunghezza d'onda di 600 nm, compreso tra 0,5 e 1,2.

La densità ottica è stata misurata il mattino seguente prelevando 1 mL di inoculo, che è stato poi inserito all'interno di una cuvetta, necessaria per la misurazione dell'O.D. tramite spettrofotometro (Figura 4b). Per le nostre prove di trasformazione è stato raggiunto un O.D. 1,2.

Successivamente l'*Agrobacterium* all'interno delle falcon è stato "pellettato" tramite centrifugazione a 2500 rpm a temperatura ambiente per 15 minuti (Figura 4c).

Una volta eliminato il surnatante, il pellet batterico è stato risospeso in MS20 liquido a cui è stato aggiunto $1 \mu\text{l mL}^{-1}$ di acetosiringone. L'MS20 è costituito da $4,4 \text{ g L}^{-1}$ di Sali MS più le vitamine e 20 g L^{-1} di saccarosio con un pH di 5,2.

La fase appena descritta è detta fase di induzione, nella quale l'acetosiringone è usato per stimolare i geni di virulenza (*vir*) dell'*Agrobacterium*, che sono i responsabili della successiva infezione del tessuto vegetale. In questa fase gli inoculi sono stati mantenuti in agitazione per due ore (Figura 4d).

Alla fase di induzione è seguita la fase di infezione nella quale gli espianti vegetali precedentemente preparati (figura 4e), mediante l'utilizzo di bisturi e pinze sterili sono stati prelevati germogli in allungamento delle due varietà di mora dai rispettivi vasi di crescita e successivamente sono stati separati i piccioli dalle foglie, su queste ultime sono stati praticati 3-4 tagli trasversali lungo la nervatura centrale nella parte abassiale della foglia, sono stati posti a contatto con MS20, $1 \mu\text{l mL}^{-1}$ di acetosiringone (20 mg L^{-1}) e *A. tumefaciens* e mantenuti in agitazione al buio per quindici minuti. Trascorso questo intervallo di tempo, gli espianti sono stati tamponati ed asciugati su dischi di carta da filtro sterili (figura 4f), al fine di eliminare l'*Agrobacterium* in eccesso e quindi evitare successive contaminazioni.

Successivamente gli espianti sono stati trasferiti su piastre Petri contenenti MSH0 solido, sulla quale sono stati precedentemente posizionati dischi di carta da filtro sterili imbevuti di $500 \mu\text{l}$ di MS20 con acetosiringone.

MSHO è un substrato di co-coltura per *Agrobacterium* e tessuti vegetali ed è composto da: $4,4 \text{ g L}^{-1}$ di sali MS più le vitamine, 30 g L^{-1} di saccarosio, 7 g L^{-1} di plant agar con un pH aggiustato a 5,7 utilizzando KOH come tampone.

Le piastre Petri sono state incubate al buio in camera di crescita per due giorni.

Trascorsi i due giorni di co-coltura, gli espianti sono stati trasferiti sul terreno di selezione/rigenerazione precedentemente ottimizzato in base al genotipo e alla tipologia di espianto (Tabella 2) e ogni tre settimane trasferiti su terreni freschi identici al precedente ma con una concentrazione di TDZ dimezzata.

Tabella 2: Composizione dei terreni di selezione/rigenerazione utilizzati per la prova di trasformazione genetica di Loch Tay e Loch Ness mediata da *A. tumefaciens*, ottimizzati in base al genotipo ed alla tipologia di espianto.

	Loch Tay		Loch Ness	
	Foglia	Picciolo	Foglia	Picciolo
Sali	MS 4,4 g L ⁻¹	Ms 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹
Carboidrati	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹
Regolatori di crescita	TDZ 1 mg L ⁻¹	TDZ 1 mg L ⁻¹	TDZ 5 mg L ⁻¹	TDZ 5 mg L ⁻¹
Agar	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹
pH	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8
Antibiotico di selezione (kanamicina)	10 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹
Antibiotico di contenimento dell'agrobatterio	Carbenicillina 300 mg L ⁻¹	Cefotaxime 200 mg L ⁻¹	Carbenicillina 200 mg L ⁻¹	Timentina 300 mg L ⁻¹

È stata effettuata una prova di trasformazione nella quale ogni combinazione genotipo-espianto è stata testata su un complessivo di 80 espianti divisi in 8 repliche composte a loro volta da 10 unità sperimentali.

Il dato della prova di trasformazione è stato preso dopo sei settimane dall'infezione degli espianti e consisteva nell'efficienza di trasformazione degli espianti espressa come percentuale di calli esprimenti GFP / numero totale di espianti trattati.

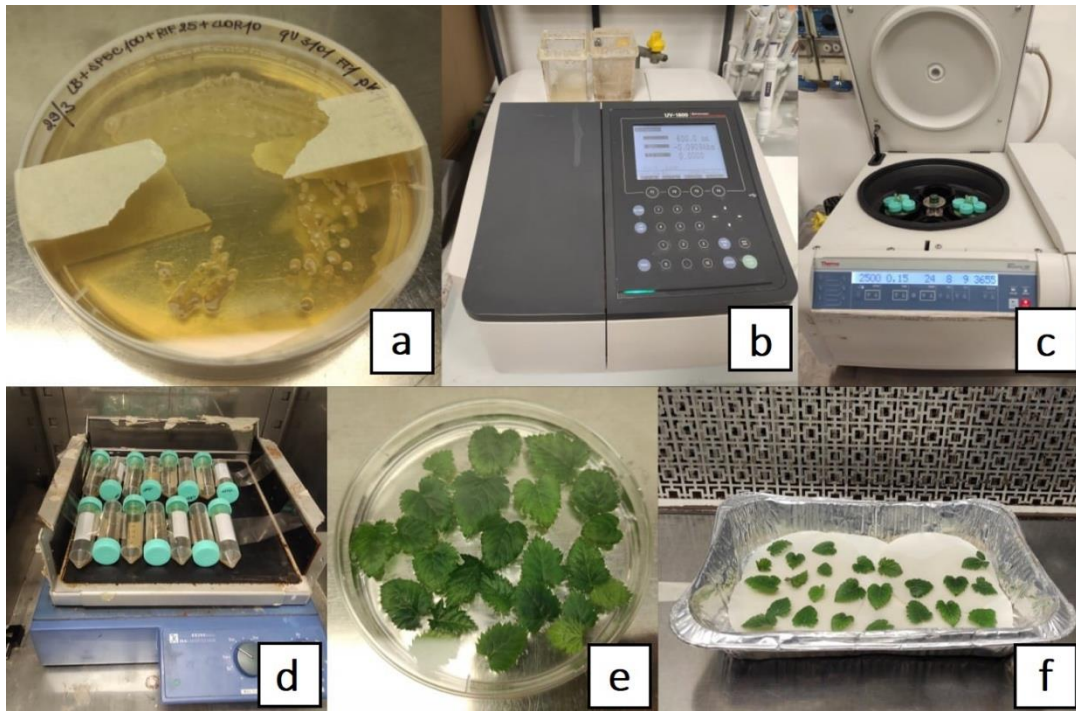


Figura 4: Alcune fasi del protocollo di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* e le relative strumentazioni utilizzate: (a) colonie di *A. tumefaciens* su LB solido; (b) spettrofotometro per misurare l'O.D. di *A. tumefaciens*; (c) centrifuga necessaria per "pellettare" *A. tumefaciens*; (d) falcon in agitazione durante la fase di induzione; (e) espianti di foglie mantenuti in acqua sterile prima di essere infettati; (f) asciugatura degli espianti successiva al processo di infezione.

3.3.3 Selezione del materiale con l'antibiotico kanamicina e detection GFP

Nelle nostre prove sperimentali la kanamicina è stata utilizzata come antibiotico di selezione, infatti, all'interno del costrutto genico dell'*Agrobacterium tumefaciens* da noi utilizzato per la trasformazione è presente il gene *NPTII* che conferisce la resistenza alla kanamicina.

Nel costrutto genico è stato inserito anche il gene reporter GFP, che ci permette una selezione visiva del materiale vegetale che ha subito la trasformazione genetica.

La GFP è stata osservata attraverso uno stereo-microscopio LEICA MZ 10 F dotato di un filtro ET-GFP che permette di visualizzare la fluorescenza emessa dalle cellule trasformate, grazie all'espressione del gene GFP. La sorgente luminosa è generata da una lampada da 100 W ad alta intensità; le fotografie sono state scattate col sistema fotomicrografico Leica DFC 450 C. Per la cattura delle immagini, l'archiviazione e l'elaborazione è stato utilizzato Leica Application Suite (LAS) V4.5.

3.4 Test statistico utilizzato

I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via, e il test di Newman-Keuls ($p < 0.05$) \pm SE è stato usato per identificare differenze significative.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono riportati i dati acquisiti e la relativa analisi statistica delle prove sperimentali svolte, relativi all'efficienza di rigenerazione e di trasformazione degli espianti dei due genotipi di mora (*Rubus fruticosus* L.) Loch Ness e Loch Tay.

4.1 Test di tossicità a cefotaxime, carbenicillina e timentina

Al fine di evitare contaminazioni da *A. tumefaciens* nei terreni di selezione/rigenerazione da utilizzare nelle prove di trasformazione genetica di Loch Ness e Loch Tay, abbiamo testato singolarmente l'efficienza di rigenerazione degli espianti vegetali in presenza di tre diversi antibiotici a due diverse concentrazioni, 200 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹.

Gli antibiotici con i quali sono stati condotti i test, cefotaxime, carbenicillina e timentina, sono solitamente efficaci per la decontaminazione da agrobatterio durante la rigenerazione post-infezione degli espianti vegetali di molte specie.

Il test è stato condotto per valutare e confrontare la risposta rigenerativa degli espianti agli antibiotici, con il fine di trovare l'antibiotico più idoneo da utilizzare nel terreno di rigenerazione della successiva prova di trasformazione.

I test di tossicità sono stati condotti su entrambe le tipologie di espianto, foglia e picciolo, delle due cultivars prese in esame. Abbiamo osservato che in entrambi i genotipi, usando le foglie come espianto di partenza, il cefotaxime risulta molto tossico in termini di efficienza di rigenerazione; la tossicità maggiore riscontrata in foglie, è avvenuta in Loch Ness con 300 mg L⁻¹ di cefotaxime, in cui si è osservata una riduzione della frequenza di rigenerazione fino al 1,3% ± 4,6 con un numero medio di germogli per espianto di 0,07 ± 0,2, se confrontata con il controllo positivo (frequenza di rigenerazione del 19% ± 3,9 e numero medio di germogli per espianto di 0,38 ± 0,1) (Tabella 3). Una riduzione significativa (rispetto al controllo positivo) dell'efficienza di rigenerazione in foglia con le due concentrazioni di cefotaxime si è osservata anche in Loch Tay: con 200 mg L⁻¹ abbiamo osservato una frequenza di rigenerazione del 9,3% ± 5,8 ed un numero di germogli medio per espianto di 0,66 ± 0,36, con 300 mg L⁻¹ questi valori sono stati rispettivamente del 8% ± 5,43 e di 0,37 ± 0,39 (Tabella 3).

Così come per le foglie, il cefotaxime è risultato molto tossico anche per i piccioli di Loch Ness, riducendone l'efficienza di rigenerazione (con 200 mg L⁻¹ frequenza di rigenerazione del 8% ± 5,9 e numero medio di germogli per espianto di 0,38 ± 0,29, con 300 mg L⁻¹ frequenza di rigenerazione del 8% ± 3,8 e numero medio di germogli per espianto di 0,19 ± 0,3) (Tabella 3).

I piccioli di Loch Tay allevati su substrati addizionati con 200 mg L⁻¹ di cefotaxime, a differenza delle foglie e dei piccioli di Loch Ness, non hanno evidenziato una riduzione statisticamente significativa dell'efficienza di rigenerazione rispetto al controllo positivo (con 200 mg L⁻¹ frequenza di rigenerazione del 24% ± 3,8 e numero medio di germogli per espianto di 1 ± 0,1, con 0 mg L⁻¹ frequenza di rigenerazione del 31% ± 2,1 e numero medio di germogli per espianto di 1,1 ± 0,3) (Tabella 3).

A differenza della maggior parte dei nostri casi, il cefotaxime in uno studio condotto da Súkeníková et al. (2015), non è risultato tossico per le due cultivars di mora prese in esame ('Čačanska Bestrna' e 'Black Satin'), infatti ad una concentrazione di 250 mg L⁻¹ è stato utilizzato come antibiotico di decontaminazione in prove di trasformazione mediate da agrobatterio.

Negli espianti di foglie di entrambi i genotipi, la carbenicillina e la timentina presenti separatamente nei rispettivi terreni di coltura alle concentrazioni di 200 mg L⁻¹ e 300 mg L⁻¹, hanno sostenuto un'efficienza di rigenerazione statisticamente simile a quella osservata nei controlli positivi, che non contenevano antibiotici, (Tabella 3).

In foglie di Loch Tay l'efficienza di rigenerazione più elevata si è osservata nei substrati addizionati con 300 mg L⁻¹ di carbenicillina e 200 mg L⁻¹ di timentina, dove è stata osservata rispettivamente una frequenza di rigenerazione del 38% ± 6,93 e del 37% ± 7,05, con un numero medio di germogli per espianto di 1,36 ± 0,36 e di 2,22 ± 0,45, rispettivamente, (Tabella 3).

In foglie di Loch Ness la più elevata efficienza di rigenerazione è stata osservata in terreni con 200 mg L⁻¹ di carbenicillina (frequenza di rigenerazione del 52% ± 7,1 ed un numero medio di germogli per espianto di 1,3 ± 0,2), risultando statisticamente più elevata anche di quella osservata nel controllo positivo (Tabella 3).

Questo effetto positivo della carbenicillina sulla rigenerazione può essere dovuto al fatto che è considerata un potenziale promotore dell'organogenesi nella pianta, grazie ai composti chimici che derivano dalla sua rottura, che svolgono un ruolo simile all'auxina in grado di migliorare l'efficienza di rigenerazione in diverse specie di piante (Ricci et al., 2023).

Gli espianti di picciolo presentano risposte agli antibiotici differenti a seconda del genotipo preso in esame.

In piccioli di Loch Tay un'efficienza di rigenerazione simile al controllo (frequenza di rigenerazione del $31\% \pm 2,1$ ed un numero medio di germogli per espianto di $1,1 \pm 0,3$) è stata osservata soltanto sul terreno con 200 mg L^{-1} di cefotaxime (frequenza di rigenerazione del $24\% \pm 3,8$ ed un numero medio di germogli per espianto di $1 \pm 0,1$) (Tabella 3); tutte le altre concentrazioni dei differenti antibiotici hanno mostrato una leggera riduzione dell'efficienza di rigenerazione statisticamente molto simile tra di loro (con una media della frequenza di rigenerazione del $16,4\%$ ed un numero medio di germogli per espianto di $0,48$) (Tabella 3).

Il picciolo in Loch Tay sembra essere meno sensibile al cefotaxime rispetto alla foglia, e contrariamente a quest'ultima risulta essere più sensibile alla carbenicillina e alla timentina.

In termini di rigenerazione, gli espianti di picciolo di Loch Ness sembrano essere molto sensibili al cefotaxime, similmente a quanto osservato per le foglie in entrambi i genotipi e contrariamente a quanto osservato in piccioli di Loch Tay.

La più bassa efficienza di rigenerazione da piccioli di Loch Ness si osserva con 300 mg L^{-1} di cefotaxime (frequenza di rigenerazione del $8\% \pm 3,8$ e numero medio di germogli per espianto di $0,19 \pm 0,3$) che presenta valori nettamente inferiori al controllo positivo (frequenza di rigenerazione del $26\% \pm 3,6$ ed una media di germogli per espianto di $1,06 \pm 0,1$) (Tabella 3).

I piccioli di Loch Ness con le due concentrazioni di carbenicillina e timentina, hanno presentato un'efficienza di rigenerazione statisticamente simile a quella osservata nel controllo positivo, eccezion fatta per 300 mg L^{-1} di carbenicillina dove l'efficienza di rigenerazione è risultata più bassa (frequenza di rigenerazione del $6\% \pm 3,4$ e numero medio di germogli per espianto di $0,32 \pm 0,26$) (Tabella 3).

In generale possiamo affermare che nelle nostre sperimentazioni gli antibiotici ad avere minore impatto negativo, spesso nullo, sulla rigenerazione degli espianti sono stati la carbenicillina e la timentina, presentando nella maggior parte dei casi valori del tutto simili al controllo positivo. La timentina sembra comportarsi in maniera simile con entrambe le concentrazioni testate. La concentrazione più bassa di carbenicillina (200 mg L^{-1}) risulta essere la concentrazione più indicata nella maggior parte dei casi, con influenze spesso nulle sulla rigenerazione, in alcuni casi positive.

Il cefotaxime, indipendentemente dalla concentrazione testata, risulta nella maggior parte dei casi influenzare negativamente e in maniera molto marcata la rigenerazione, in accordo con McNicol e Graham (1989).

Tabella 3: Frequenza di rigenerazione e numero medio di germogli in foglie e piccioli di Loch Ness e Loch Tay testati su substrati addizionati con due diverse concentrazioni dei seguenti antibiotici: cefotaxime, carbenicillina e timentina. I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via. Lettere diverse nella stessa colonna mostrano differenze significative a $p < 0,05$ mediante il test di Newman-Keuls $\pm SE$. Ciascun dato rappresenta la media $\pm SE$ di due prove indipendenti.

Antibiotici	mg L ⁻¹	Frequenza di rigenerazione (%) $\pm SE$				Numero medio di germogli/espianto $\pm SE$			
		Loch Ness		Loch Tay		Loch Ness		Loch Tay	
		Foglia	Picciolo	Foglia	Picciolo	Foglia	Picciolo	Foglia	Picciolo
Nessuno	0	19 \pm 3,9 ^(b)	26 \pm 3,6 ^(a)	32 \pm 5,9 ^(a)	31 \pm 2,1 ^(a)	0,38 \pm 0,1 ^(b)	1,06 \pm 0,1 ^(a)	1,2 \pm 0,29 ^(a)	1,1 \pm 0,3 ^(a)
Cefotaxime	200	2,7 \pm 3,9 ^(c)	8 \pm 5,9 ^(b)	9,3 \pm 5,8 ^(b)	24 \pm 3,8 ^(a)	0,09 \pm 0,2 ^(c)	0,38 \pm 0,29 ^(b)	0,66 \pm 0,36 ^(b)	1 \pm 0,1 ^(a)
	300	1,3 \pm 4,6 ^(c)	8 \pm 3,8 ^(b)	8 \pm 5,43 ^(b)	18 \pm 5,2 ^(b)	0,07 \pm 0,2 ^(c)	0,19 \pm 0,3 ^(b)	0,37 \pm 0,39 ^(b)	0,75 \pm 0,36 ^(a)
Carbenicillina	200	52 \pm 7,1 ^(a)	30 \pm 6,5 ^(a)	28 \pm 6,41 ^(a)	16 \pm 5,23 ^(b)	1,3 \pm 0,2 ^(a)	0,92 \pm 0,27 ^(a)	1,5 \pm 0,39 ^(a)	0,6 \pm 0,29 ^(b)
	300	24 \pm 6,1 ^(b)	6 \pm 3,4 ^(b)	38 \pm 6,93 ^(a)	12 \pm 4,64 ^(b)	0,92 \pm 0,3 ^(ab)	0,32 \pm 0,26 ^(b)	1,36 \pm 0,36 ^(a)	0,28 \pm 0,83 ^(b)
Timentina	200	16 \pm 5,2 ^(b)	22 \pm 5,9 ^(a)	37 \pm 7,05 ^(a)	18 \pm 5,49 ^(b)	0,5 \pm 0,2 ^(b)	1,04 \pm 0,32 ^(a)	2,22 \pm 0,45 ^(a)	0,74 \pm 0,26 ^(ab)
	300	12 \pm 4,6 ^(b)	28 \pm 6,4 ^(a)	25 \pm 6,2 ^(a)	2 \pm 2,24 ^(b)	0,36 \pm 0,2 ^(b)	1,24 \pm 0,39 ^(a)	0,97 \pm 0,35 ^(a)	0,06 \pm 0,07 ^(b)

Di seguito sono riportate le figure 5 e 6 con le foto degli espianti di Loch Ness e Loch Tay, rispettivamente, testati con i tre antibiotici (cefotaxime, carbenicillina e timentina).

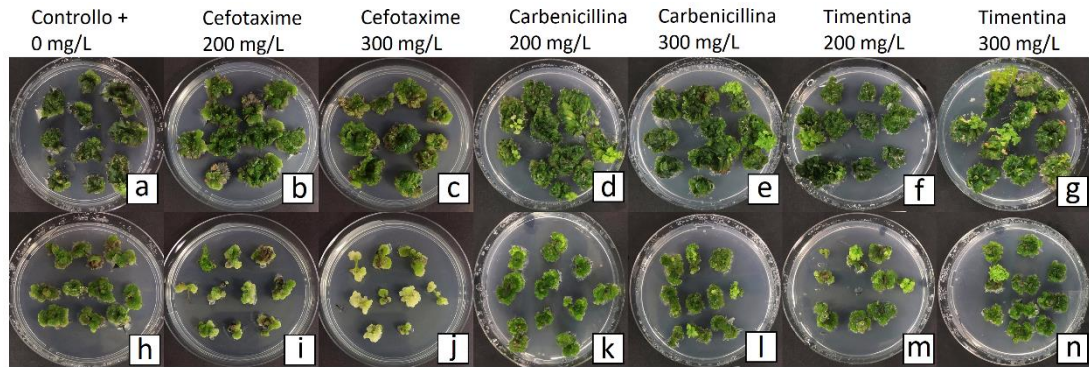


Figura 5: Foglie e piccioli di Loch Ness in terreni di rigenerazione ai quali sono state aggiunte singolarmente due diverse concentrazioni di cefotaxime, carbenicillina e timentina. Le foto sono state scattate dopo 45 giorni dalla messa in coltura degli espianti: (a) foglie del controllo positivo senza aggiunta di antibiotici; (b) foglie con 200 mg L⁻¹ di cefotaxime; (c) foglie con 300 mg L⁻¹ di cefotaxime; (d) foglie con 200 mg L⁻¹ di carbenicillina; (e) foglie con 300 mg L⁻¹ di carbenicillina; (f) foglie con 200 mg L⁻¹ di timentina; (g) foglie con 300 mg L⁻¹ di timentina; (h) piccioli del controllo positivo senza aggiunta di antibiotici; (i) piccioli con 200 mg L⁻¹ di cefotaxime; (j) piccioli con 300 mg L⁻¹ di cefotaxime; (k) piccioli con 200 mg L⁻¹ di carbenicillina; (l) piccioli con 300 mg L⁻¹ di carbenicillina; (m) piccioli con 200 mg L⁻¹ di timentina; (n) piccioli con 300 mg L⁻¹ di timentina.

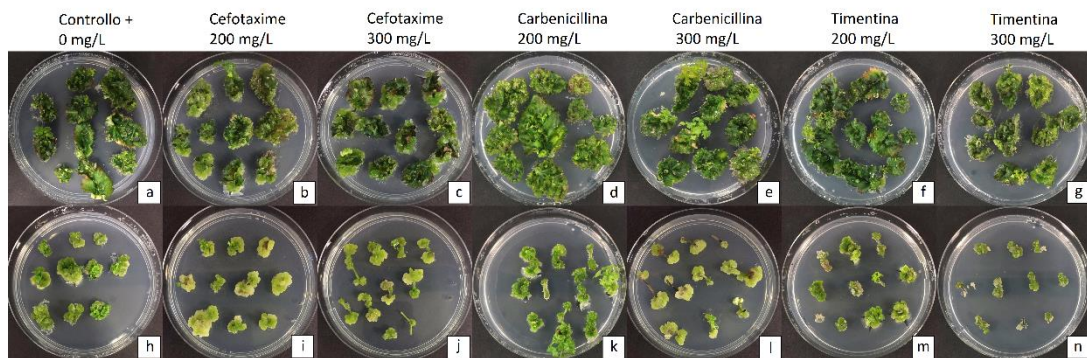


Figura 4: Foglie e piccioli di Loch Tay in terreni di rigenerazione ai quali sono state aggiunte singolarmente due diverse concentrazioni di cefotaxime, carbenicillina e timentina. Le foto sono state scattate dopo 45 giorni dalla messa in coltura degli espianti: (a) foglie del controllo positivo senza aggiunta di antibiotici; (b) foglie con 200 mg L⁻¹ di cefotaxime; (c) foglie con 300 mg L⁻¹ di cefotaxime; (d) foglie con 200 mg L⁻¹ di carbenicillina; (e) foglie con 300 mg L⁻¹ di carbenicillina; (f) foglie con 200 mg L⁻¹ di timentina; (g) foglie con 300 mg L⁻¹ di timentina; (h) piccioli del controllo positivo senza aggiunta di antibiotici; (i) piccioli con 200 mg L⁻¹ di cefotaxime; (j) piccioli con 300 mg L⁻¹ di cefotaxime; (k) piccioli con 200 mg L⁻¹ di carbenicillina; (l) piccioli con 300 mg L⁻¹ di carbenicillina; (m) piccioli con 200 mg L⁻¹ di timentina; (n) piccioli con 300 mg L⁻¹ di timentina.

4.2 Test di tossicità alla kanamicina

Preliminarmente alla prova di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*, abbiamo condotto due test di tossicità alla kanamicina con il fine di stabilire la giusta concentrazione dell'antibiotico da utilizzare nei terreni di selezione/rigenerazione per esercitare una maggiore pressione di selezione sui germogli potenzialmente trasformati.

Il test ha riguardato le due differenti tipologie di espianto, picciolo e foglia, di entrambi i genotipi di mora, Loch Ness e Loch Tay.

Le concentrazioni di kanamicina testate sono state le seguenti: 0 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹ e 80 mg L⁻¹.

Gli espianti di Loch Ness e Loch Tay sono stati coltivati su terreni di rigenerazione precedentemente ottimizzati in questo laboratorio alla quale sono state aggiunte le diverse concentrazioni dell'antibiotico.

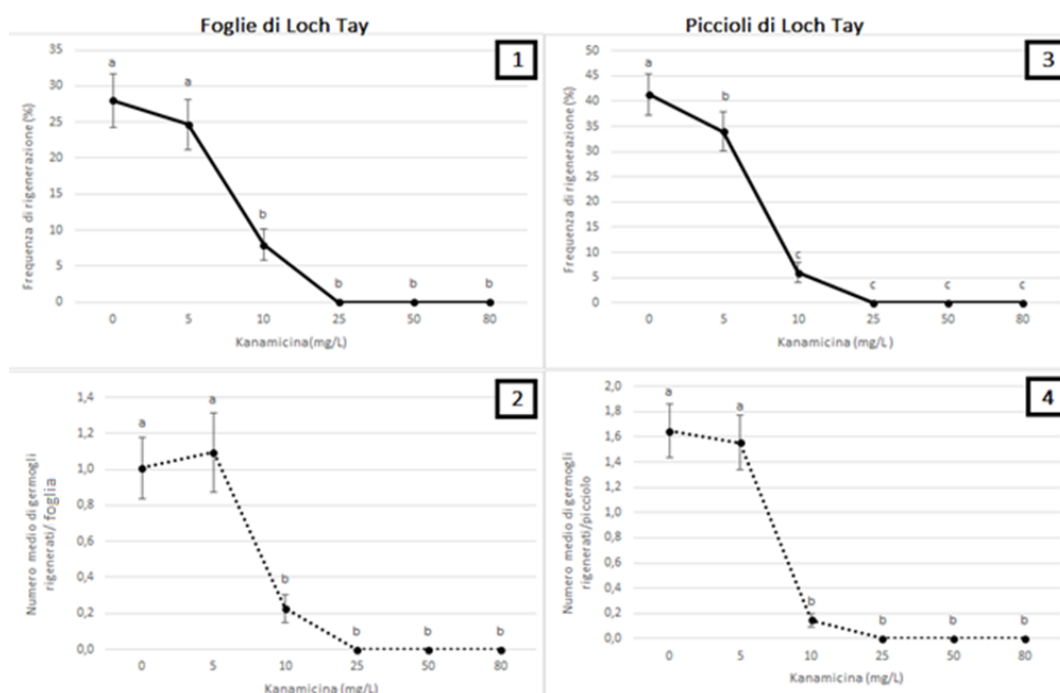
L'influenza della kanamicina sulla rigenerazione degli espianti è stata valutata dopo 45 giorni dalla messa in coltura dell'espianto nel terreno di rigenerazione.

In Loch Tay un aumento della concentrazione di kanamicina nei terreni di coltura ha portato ad una minor frequenza di rigenerazione e ad un minore numero di germogli sviluppatosi dagli espianti, presentando in foglia un'efficienza di rigenerazione statisticamente simile al controllo positivo (frequenza di rigenerazione del 28% ± 3,68 e numero medio di germogli per espianto di 1 ± 0,17) soltanto con la più bassa concentrazione di kanamicina da noi testata, 5 mg L⁻¹ (frequenza di rigenerazione del 24,67% ± 3,53 e numero medio di germogli per espianto di 1,09 ± 0,22) (Grafici 1 e 2); in picciolo l'efficienza di rigenerazione si abbassa rispetto al controllo positivo (frequenza di rigenerazione del 41,33% ± 4,03 e numero medio di germogli per espianto di 1,65 ± 0,21) anche con 5 mg L⁻¹ di kanamicina (frequenza di rigenerazione del 34% ± 3,88 e numero medio di germogli per espianto di 1,55 ± 0,22) (Grafici 3 e 4) risultando più sensibile all'antibiotico rispetto alla foglia soprattutto per quanto riguarda la frequenza di rigenerazione.

In generale in Loch Tay si osserva una minore efficienza di rigenerazione all'aumentare della concentrazione di kanamicina sino ad arrivare ad un punto in cui l'antibiotico la inibisce totalmente (Grafici 1,2,3 e 4), in accordo con quanto riportato da Súkeníková et al., (2015).

L'abbattimento totale della rigenerazione in Loch Tay è avvenuto con una concentrazione di kanamicina di 25 mg L⁻¹, risultati simili sono stati ottenuti in mora da Hassan et al., (1993), dove una concentrazione dell'antibiotico di 20 mg L⁻¹ ha ridotto l'organogenesi fino al 2%.

Diversi autori confermano l'influenza negativa della kanamicina sull'efficienza di rigenerazione degli espianti di *Rubus* (Fiola et al., 1990; Graham e McNicol, 1990; Hassan et al., 1993; De Faria et al., 1997; Gill et al., 2004; M. Súkeniková et al., 2015).



Grafici 1,2,3e 4: Frequenza di rigenerazione e numero medio di germogli per espianto di foglie e piccioli di Loch Tay testati a diverse concentrazioni di kanamicina: frequenza di rigenerazione in foglie (1); numero medio di germogli rigenerati per foglia (2); frequenza di rigenerazione in piccioli (3); numero medio di germogli rigenerati per picciolo (4). I dati sono stati presi dopo 45 giorni dalla messa in coltura degli espianti vegetali e sono stati analizzati con ANOVA a una via. Lettere diverse nello stesso grafico mostrano differenze significative a $p < 0,05$ mediante il test di Newman-Keuls \pm SE. Ciascun dato rappresenta la media \pm SE di due prove indipendenti.

In foglie di Loch Ness, con le concentrazioni di kanamicina di 10 mg L⁻¹ e 25 mg L⁻¹, la frequenza di rigenerazione osservata è stata rispettivamente del 6% \pm 1,94 e del 7,33% \pm 2,13, percentuali statisticamente simili a quelle delle foglie in rigenerazione su terreno senza antibiotico (8,67% \pm 2,3) (Grafico 5); anche per quanto riguarda il numero di germogli per espianto, nelle due concentrazioni sopra menzionate (con 10 mg L⁻¹ un numero medio di germogli di 0,24 \pm 0,08 e con 25 mg L⁻¹ un numero medio di germogli di 0,18 \pm 0,07) non sono state osservate differenze significative con le foglie in rigenerazione su terreno senza antibiotici (numero medio di germogli per espianto di 0,16 \pm 0,05) (Grafico 6).

L'andamento dell'efficienza di rigenerazione osservata sulle foglie di Loch Ness risulta simile a quello osservato nei piccioli della medesima cultivar, con la differenza che in picciolo

l'efficienza di rigenerazione con una concentrazione della kanamicina di 25 mg L^{-1} , è scesa al $4\% \pm 1,6$, risultando nettamente inferiore rispetto alla frequenza del $15,33\% \pm 2,95$ osservata nei terreni senza kanamicina (Grafico 7) pur preservando un buon numero di germogli per espianto, con valori di $0,35 \pm 0,09$ con 0 mg L^{-1} di kanamicina, $0,88 \pm 0,22$ con 10 mg L^{-1} e $0,12$ con $25 \text{ mg L}^{-1} \pm 0,05$ (Grafico 8).

In Loch Ness, con la concentrazione di kanamicina più bassa da noi testata (5 mg L^{-1}), si è osservata stranamente una minor efficienza di rigenerazione (frequenza di rigenerazione $4\% \pm 1,6$ e numero medio di germogli per espianto di $0,05 \pm 0,02$ in foglia e rispettivamente del $4\% \pm 1,6$ e $0,08 \pm 0,04$ in picciolo) rispetto al controllo positivo e alle concentrazioni di 10 mg L^{-1} e 25 mg L^{-1} (Grafici 5,6,7 e 8).

Il genotipo Loch Tay risulta più efficiente di Loch Ness in termini di rigenerazione; nelle nostre prove sperimentali Loch Tay, a basse (5 mg L^{-1}) o nulle concentrazioni di kanamicina, ha presentato in generale una frequenza di rigenerazione ed un numero medio di germogli per espianto maggiore rispetto a Loch Ness, indipendentemente dalla tipologia di espianto utilizzata, pur risultando più sensibile all'antibiotico rispetto a quest'ultimo.

In entrambe le tipologie di espianto, sia in Loch Ness che in Loch Tay, elevate concentrazioni di kanamicina inibiscono totalmente l'efficienza di rigenerazione, infatti, a prescindere dalla tipologia di espianto utilizzata, in Loch Tay la rigenerazione è stata completamente inibita utilizzando una concentrazione di kanamicina pari a 25 mg L^{-1} (Grafici 1 e 3), situazione che si presenta in Loch Ness con una concentrazione doppia dell'antibiotico rispetto al precedente genotipo (50 mg L^{-1}) (Grafici 5 e 7).

Risultati simili su espianti di mora, di totale inibizione della rigenerazione, sono stati ottenuti con una concentrazione di 40 mg L^{-1} di kanamicina da M. Súkeníková et al. (2015).

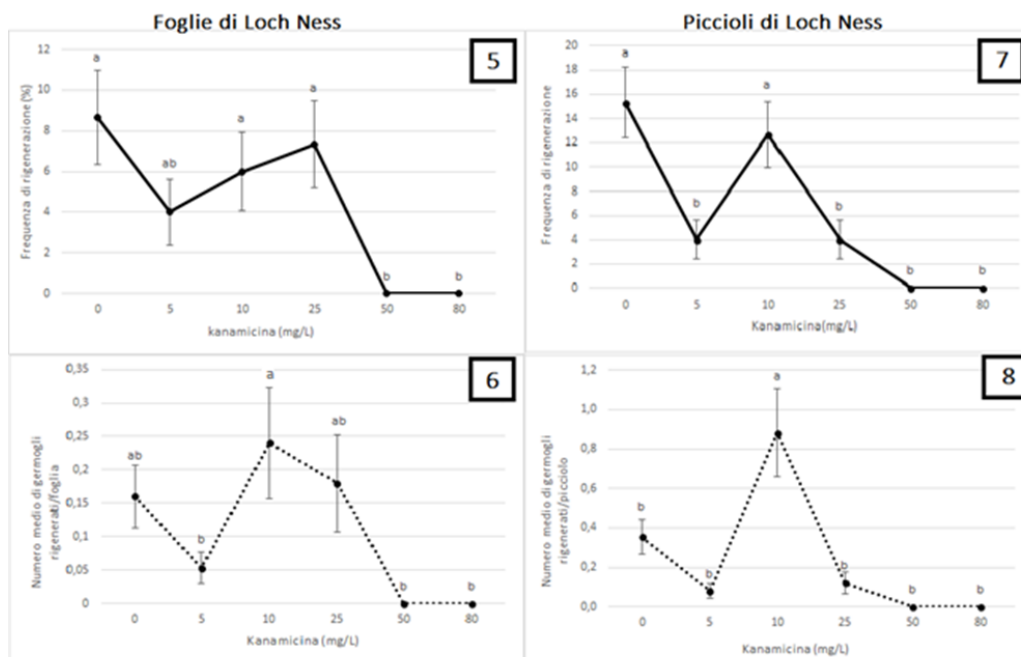
Il picciolo di entrambi i genotipi risulta l'espianto con una maggiore efficienza di rigenerazione con nulla o basse concentrazioni dell'antibiotico, 0 mg L^{-1} e 5 mg L^{-1} .

La foglia in Loch Ness sembra essere più resistente rispetto al picciolo con una concentrazione di 25 mg L^{-1} (concentrazione massima che permette ancora rigenerazione degli espianti), permettendo in quest'ultima una frequenza di rigenerazione del $7,33\% \pm 2,13$ (Grafico 5), che si abbassa al $4\% \pm 1,6$ in picciolo (Grafico 7).

La risposta di Loch Tay all'aumento della concentrazione di kanamicina appare leggermente diversa rispetto a Loch Ness. In Loch Tay una discreta efficienza di rigenerazione è stata osservata fino alla concentrazione di kanamicina di 10 mg L^{-1} , sia in foglia (frequenza di rigenerazione del $8\% \pm 2,22$ ed un numero medio di germogli per espianto di $0,23 \pm 0,08$) (Grafici 1 e 2) che in picciolo (frequenza di rigenerazione del $6\% \pm 1,94$ ed un numero medio

di germogli per espianto di $0,14 \pm 0,05$) (Grafici 3 e 4), presentando valori nettamente inferiori rispetto agli espianti coltivati su terreni senza kanamicina (frequenza di rigenerazione in foglia del $28\% \pm 3,68$ ed un numero medio di $1 \pm 0,17$ germogli per espianto e rispettivamente di $41,33\% \pm 4,03$ e di $1,65 \pm 0,21$ in picciolo) (Grafici 1,2,3 e 4).

Sulla base di quanto affermato da altri autori, basse concentrazioni di kanamicina possono essere utilizzate per la selezione del materiale transgenico in mora (*Graham et al., 1995*); una bassa concentrazione dell'antibiotico è infatti capace di limitare l'accrescimento senza abbattere totalmente la rigenerazione, permettendoci la selezione del materiale potenzialmente trasformato; partendo da questo presupposto e basandoci sui risultati delle nostre prove sperimentali abbiamo scelto di utilizzare nei terreni di selezione/rigenerazione delle successive prove di trasformazione genetica, una concentrazione di 10 mg L^{-1} di kanamicina per il genotipo Loch Tay e di 25 mg L^{-1} per il genotipo Loch Ness; le concentrazioni di kanamicina utilizzate sono state uguali sia per i piccioli che per le foglie all'interno dello stesso genotipo.



Grafici 5, 6, 7 e 8: Frequenza di rigenerazione e numero medio di germogli per espianto di foglie e piccioli di Loch Ness testati a diverse concentrazioni di kanamicina: frequenza di rigenerazione in foglie (1); numero medio di germogli rigenerati per foglia (2); frequenza di rigenerazione in piccioli (3); numero medio di germogli rigenerati per picciolo (4). I dati sono stati presi dopo 45 giorni dalla messa in coltura degli espianti vegetali e sono stati analizzati con ANOVA a una via. Lettere diverse nello stesso grafico mostrano differenze significative a $p < 0,05$ mediante il test di Newman-Keuls \pm SE. Ciascun dato rappresenta la media \pm SE di due prove indipendenti.

Di seguito sono riportate le figure 7 e 8 in cui sono presenti rispettivamente le foto degli espianti di Loch Tay e Loch Ness dopo 45 giorni dalla messa in coltura su terreni con le diverse concentrazioni di kanamicina testate.

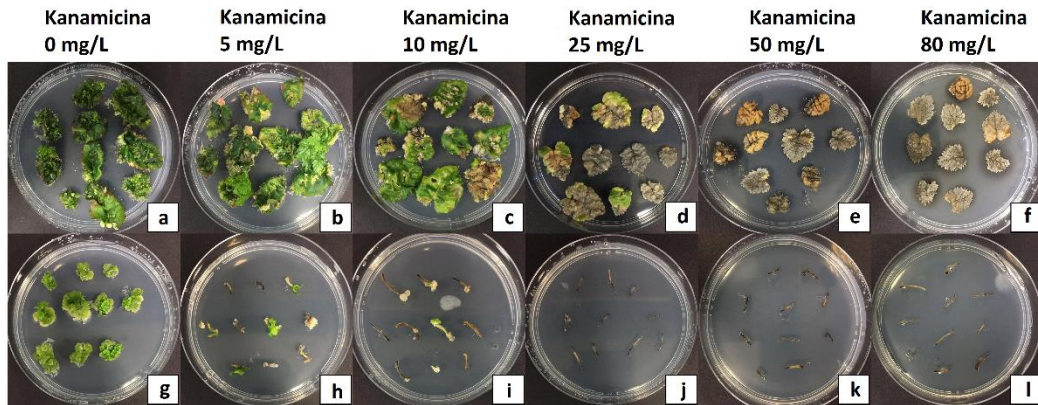


Figura 5: Foglie e piccioli di Loch Tay in terreni di rigenerazione a cui sono stati aggiunte diverse concentrazioni di kanamicina: (a) foglie con 0 mg L-1; (b) foglie con 5 mg L-1; (c) foglie con 10 mg L-1; (d) foglie con 25 mg L-1; (e) foglie con 50 mg L-1; (f) foglie con 80 mg L-1; (g) piccioli con 0 mg L-1; (h) piccioli con 5 mg L-1; (i) piccioli con 10 mg L-1; (j) piccioli con 25 mg L-1; (k) piccioli con 50 mg L-1; (l) piccioli con 80 mg L-1 .

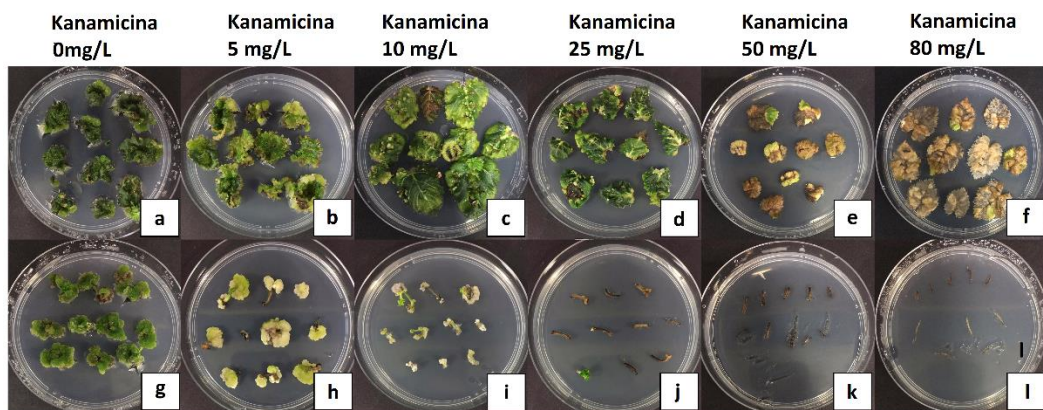


Figura 6: Foglie e piccioli di Loch Ness in terreni di rigenerazione a cui sono stati aggiunte diverse concentrazioni di kanamicina: (a) foglie con 0 mg L-1; (b) foglie con 5 mg L-1; (c) foglie con 10 mg L-1; (d) foglie con 25 mg L-1; (e) foglie con 50 mg L-1; (f) foglie con 80 mg L-1; (g) piccioli con 0 mg L-1; (h) piccioli con 5 mg L-1; (i) piccioli con 10 mg L-1; (j) piccioli con 25 mg L-1; (k) piccioli con 50 mg L-1; (l) piccioli con 80 mg L-1 .

4.3 Prova di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*

Abbiamo condotto una prova di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* sui due genotipi di mora, Loch Ness e Loch Tay, con il fine di introdurre il gene *FveFT2*, responsabile della rifioritura in fragola (Gaston et al., 2021).

La prova di trasformazione è stata condotta utilizzando come espianti di partenza sia le foglie che i piccioli. Entrambe le tipologie di espianto sono state utilizzate da diversi autori in prove di trasformazione mediate da *A. tumefaciens* del genere *Rubus* (Swartz et al., 1990; Turk et al., 1994; Mathews et al., 1995; Tsao e Reed, 2002; Meng et al., 2004; Zawadska e Orlikowska, 2006; Lazić e Ružić, 2007; Gupta e Mahalaxmi, 2009; Vujović et al., 2010; A. Gajdošová et al., 2015).

Gli espianti, una volta infettati con *A. tumefaciens* ceppo GV3101 contenente il costrutto 35S::FveFT2 e mantenuti per due giorni in co-coltura, sono stati trasferiti sul terreno di selezione/rigenerazione da noi ottimizzato.

La scelta del terreno di selezione/rigenerazione utilizzato nella prova di trasformazione è stata differente per i due genotipi e per le due tipologie di espianto vegetale, basandoci sulla risposta rigenerativa che hanno presentato nei precedenti test di tossicità agli antibiotici da noi svolti.

Di seguito è riportata la tabella 2 nella quale è indicata la composizione dei terreni di selezione/rigenerazione da noi utilizzati nella prova di trasformazione genetica.

Tabella 2: Composizione dei terreni di selezione/rigenerazione utilizzati per la prova di trasformazione genetica di Loch Tay e Loch Ness mediata da *A. tumefaciens*, ottimizzati in base al genotipo ed alla tipologia di espianto.

	Loch Tay		Loch Ness	
	Foglia	Picciolo	Foglia	Picciolo
Sali	MS 4,4 g L ⁻¹	Ms 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹	MS 4,4 g L ⁻¹
Carboidrati	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹	Saccarosio 20 g L ⁻¹
Regolatori di crescita	TDZ 1 mg L ⁻¹	TDZ 1 mg L ⁻¹	TDZ 5 mg L ⁻¹	TDZ 5 mg L ⁻¹
Agar	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹	7 g L ⁻¹
pH	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8	5.7 – 5.8
Antibiotico di selezione (kanamicina)	10 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹	25 mg L ⁻¹
Antibiotico di contenimento dell'agrobatterio	Carbenicillina 300 mg L ⁻¹	Cefotaxime 200 mg L ⁻¹	Carbenicillina 200 mg L ⁻¹	Timentina 300 mg L ⁻¹

I dati presi dopo sei settimane dall'infezione riguardano l'efficienza di trasformazione, valutata sulla percentuale di calli potenzialmente trasformati esprimenti eGFP.

Ogni tre settimane successive all'infezione, gli espianti infettati sono stati trasferiti su terreni di selezione/rigenerazione freschi nella quale la concentrazione di TDZ è stata dimezzata rispetto alla concentrazione iniziale, con il fine di evitare un'eccessiva formazione di callo.

In seguito all'analisi statistica dei dati osservati, in entrambi i genotipi la foglia risulta l'espianto che si presta meglio alla modifica genetica indotta da *A. tumefaciens* e il genotipo Loch Ness sembra essere meno recalcitrante alla trasformazione rispetto a Loch Tay (in Loch Ness il $33,75\% \pm 5,32$ delle foglie ha presentato callo esprimente eGFP, in picciolo il dato si abbassa al $2,5\% \pm 1,76$; in Loch Tay abbiamo rispettivamente valori del $1,25\% \pm 0,25$ in foglia e 0% in picciolo) (Grafico 9).

Si è osservato come l'espressione di eGFP nei calli formati dalle foglie di Loch Ness risultasse di dimensioni maggiori rispetto agli spot di eGFP presenti nei calli che si sono formati dalle foglie di Loch Tay (Figura 9).

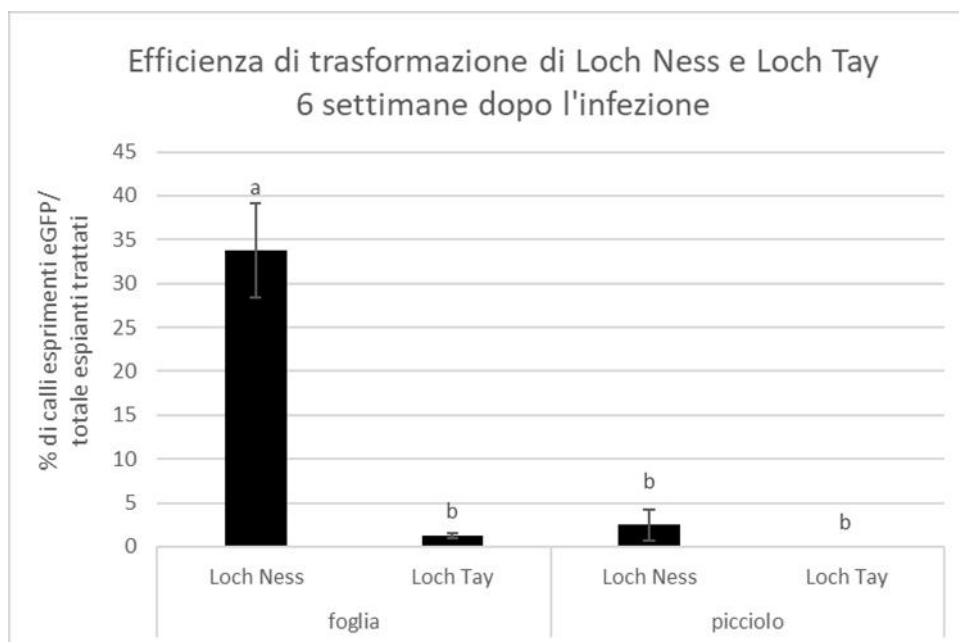


Grafico 9: Efficienza di trasformazione di foglie e piccioli di Loch Ness e Loch Tay dopo sei settimane dall'infezione con *A. tumefaciens*, espressa come percentuale di calli esprimenti eGFP sul totale degli espianti trattati. I dati sono stati analizzati con ANOVA a una via. Lettere diverse mostrano differenze significative a $p < 0,05$ mediante il test di Newman-Keuls \pm SE. Ciascun dato rappresenta la media \pm SE della prova sperimentale.

I calli esprimenti eGFP sono ancora in fase di crescita e saranno seguiti al fine di verificare la possibilità di rigenerare germogli putativamente ingegnerizzati. Le basse frequenze di

rigenerazioni richiedono numeri più elevati di tessuti trattati al fine di aumentare la probabilità di avere rigenerati putativamente trasformati. Per questo motivo, utilizzando i protocolli sviluppati da questa tesi, si continuerà ad effettuare prove di trasformazione con *Agrobacterium* con l'obiettivo di ottenere un numero minimo di linee geneticamente trasformate, utili per sperimentare l'effetto del gene inserito sull'habitus unifero delle varietà di mora oggetto di studio.

La trasformazione genetica in *Rubus* spp. è stata studiata da diversi autori (*Graham e McNicol, 1990; Fiola et al., 1990; Hassan et al., 1993; Mathews et al., 1995; De Faria et al. 1997; Mezzetti et al., 2004; Georgieva et al., 2008; A. Gajdošová et al., 2015; Súkeníková et al., 2015*) ed essa risulta problematica principalmente a causa delle difficoltà nello sviluppo di sistemi di rigenerazione efficienti e anche della tossicità di antibiotici comunemente usati, come la kanamicina per selezionare i tessuti transgenici e cefotaxime o carbenicillina per bloccare la crescita di *Agrobacterium* sui tessuti vegetali (*R.J. McNicol and J. Graham, 1999*).

Anche se per alcune specie già esiste il corretto protocollo di rigenerazione, è noto che lo stato transgenico delle cellule potrebbe influenzare negativamente la loro capacità di rigenerazione e quindi risulta necessaria la successiva modifica del protocollo di rigenerazione (*A. Gajdošová et al., 2015*).

Súkeníková et al., (2015) lavorando su due differenti genotipi dai due presentati in questo studio, sono riusciti ad ottenere germogli di mora geneticamente modificati, osservando una risposta genotipo-specifica alla trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*.

A dispetto di qualche risultato parziale, in *Rubus* spp. l'effettiva rigenerazione delle piante transgeniche è notevolmente limitata a pochi genotipi di lampone e mora ibrida (*Finn e Hancock 2008; Aldwinckle e Malnoy 2009; A. Gajdošová et al., 2015*).

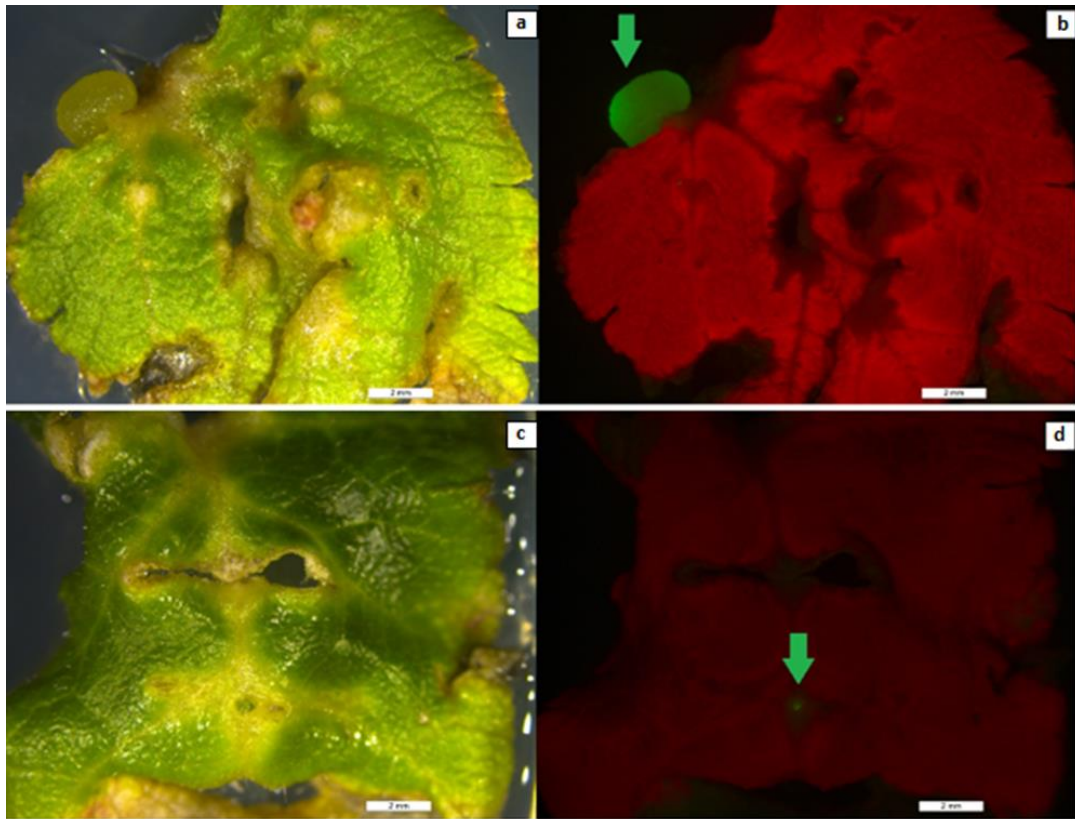


Figura 7: Callo esprimente eGFP in foglia di Loch Ness osservato al microscopio in luce bianca (a) e osservato al microscopio con il filtro ET-GFP (b). Callo esprimente eGFP in foglia di Loch Tay osservato al microscopio in luce bianca (c) e visualizzato al microscopio con il filtro ET-GFP (d). Le fotografie sono scattate col sistema fotomicrografico Leica DFC 450 C sei settimane dopo l'infezione.

5 CONCLUSIONI

In seguito alle nostre prove sperimentali condotte con diversi antibiotici di decontaminazione, comunemente utilizzati per contenere lo sviluppo di *A. tumefaciens* all'interno dei terreni di selezione/rigenerazione, possiamo affermare che il cefotaxime risulta influenzare negativamente e in maniera molto marcata la rigenerazione sia in picciolo che in foglia di Loch Ness. In Loch Tay l'elevata tossicità del cefotaxime l'abbiamo riscontrata soltanto in foglia.

In generale possiamo affermare che nelle nostre sperimentazioni gli antibiotici ad avere minore impatto negativo, spesso nullo, sulla rigenerazione delle foglie di entrambi i genotipi e sui piccioli di Loch Ness sono stati la carbenicillina e la timentina alle concentrazioni testate.

Di seguito sono riportati gli antibiotici e le relative concentrazioni, differenti in base al genotipo e alla tipologia di espianto utilizzata, che hanno presentato la più elevata efficienza di rigenerazione presentando valori statisticamente simili a quelli osservati nel controllo positivo; questi sono stati utilizzati successivamente per la prova di trasformazione genetica.

- Per le foglie di Loch Tay 300 mg L⁻¹ di carbenicillina (frequenza di rigenerazione del 38% ± 6,93 con un numero medio di germogli per espianto di 1,36 ± 0,36).
- Per i piccioli di Loch Tay 200 mg L⁻¹ di cefotaxime (frequenza di rigenerazione del 24% ± 3,8 e numero medio di germogli per espianto di 1 ± 0,1).
- Per foglie di Loch Ness 200 mg L⁻¹ di carbenicillina (frequenza di rigenerazione del 52% ± 7,1 ed un numero medio di germogli per espianto di 1,3 ± 0,2), qui l'efficienza di rigenerazione risulta statisticamente più elevata anche di quella osservata nel controllo positivo.
- Per piccioli di Loch Ness 300 mg L⁻¹ di timentina (frequenza di rigenerazione del 28% ± 6,4 e numero medio di germogli per espianto di 1,24 ± 0,39).

La giusta concentrazione di kanamicina all'interno dei terreni di selezione/rigenerazione, utilizzati per gli espianti vegetali infettati da *A. tumefaciens*, permette di esercitare una pressione selettiva sui germogli potenzialmente trasformati, favorendo la rigenerazione di questi ultimi a discapito di quelli non trasformati.

In entrambe le tipologie di espianto, sia in Loch Ness che in Loch Tay, elevate concentrazioni di kanamicina inibiscono totalmente l'efficienza di rigenerazione; in Loch Tay, sia in picciolo che in foglia, la rigenerazione è stata completamente inibita utilizzando una concentrazione di kanamicina pari a 25 mg L⁻¹. La stessa situazione si presenta in Loch Ness, sia in picciolo che in foglia, con una concentrazione doppia dell'antibiotico rispetto al precedente genotipo (50 mg L⁻¹).

La concentrazione di kanamicina ottimale da utilizzare nei terreni di selezione/rigenerazione, in seguito all'infezione degli espianti vegetali da parte di *A. tumefaciens*, deve essere quindi capace di limitare l'accrescimento senza però abbattere totalmente la rigenerazione, permettendoci così di selezionare il materiale vegetale potenzialmente trasformato. Le concentrazioni individuate per il raggiungimento di questo scopo sono state di 10 mg L⁻¹ per Loch Tay e di 25 mg L⁻¹ per Loch Ness; le concentrazioni di kanamicina individuate sono uguali sia per i piccioli che per le foglie all'interno dello stesso genotipo.

I due differenti test di tossicità agli antibiotici ci hanno permesso di ottimizzare il terreno di selezione/rigenerazione da utilizzare per la prova di trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* per il carattere della rifioritura in fragola. Si specifica che i terreni differenti sono stati utilizzati in base al genotipo ed alla tipologia di espianto.

In seguito alla prova di trasformazione genetica, valutando la percentuale di calli neoformati esprimenti eGFP, è stato osservato come in entrambi i genotipi la foglia risulti essere l'espianto iniziale più adatto alla trasformazione genetica. Tra le due varietà oggetto di sperimentazione, è Loch Ness la meno recalcitrante alla modifica genetica indotta da *A. tumefaciens* rispetto a Loch Tay. Nello specifico, in Loch Ness il 33,75% ± 5,32 delle foglie ha presentato callo esprimente eGFP, mentre in picciolo il dato si abbassa al 2,5% ± 1,76; in Loch Tay abbiamo rispettivamente valori del 1,25% ± 0,25 in foglia e 0% in picciolo.

I calli esprimenti eGFP sono ancora in fase di crescita e saranno seguiti al fine di verificare la possibilità di rigenerare germogli putativamente ingegnerizzati. Le basse frequenze di rigenerazioni richiedono numeri più elevati di tessuti trattati al fine di aumentare la probabilità di avere rigenerati putativamente trasformati.

Utilizzando i protocolli sviluppati da questa tesi, riguardanti l'ottimizzazione dei terreni di selezione/rigenerazione e l'individuazione di un genotipo e di una tipologia di espianto iniziale meno recalcitranti alla trasformazione, si continuerà ad effettuare prove di trasformazione con *Agrobacterium* con l'obiettivo di ottenere un numero minimo di linee geneticamente

trasformate, utili per sperimentare l'effetto del gene inserito sull'habitus unifero delle varietà di mora oggetto di studio.

6 BIBLIOGRAFIA

- Aldwinckle H., Malnoy M. (2009). Plant regeneration and transformation in the Rosaceae. *Transgenic Plant Journal* 3 ((Special Issue 1)):1–39.
- Bazan-Peregrino M., Sainson R.C.A., Carlisle R.C., Thoma C., Waters R.A., Arvanitis C., Harris A.L., Hernandez-Alcoceba R. and Seymour L.W. (2013). Combining virotherapy and angiotherapy for the treatment of breast cancer. *Cancer gene therapy*, 20(8), 461-468.
- Blackberry analysis 2021. Producepay.
- Buckley B., Moore J.N. and Clark J.R. (1995). Blackberry cultivars differ in susceptibility to rosette disease. *J. Fruit Var.* 49:235-238.
- Carvalho T., Thomsen M.R.; Clark J.R. (2010). Commercial fresh blackberry shipping market growth and price trends in the United States. *Fruit News*, New York, v.10, n.2, p.8-10.
- Clark J. R., Perkins-veazie P. (2011). Prime-Ark® 45 primocane-fruiting blackberry. *HortScience*, Alexandria, v.46, p.670-673.
- Clark J. R., Strick B., Thompson A.E., Finn C.E. (2012). Progress and challenges in primocane-fruiting blackberry breeding and cultural management. *Acta Horticulturae*, The Hague, v.926, p.387-392.
- Clark J.R. (2005). Changing times for eastern United States blackberries. *HortTechnology*.
- Clark J.R., Finn C.E. (2011). Blackberry breeding and genetics. *Fruit Veg Cereal Sci Biotech* 5:27–43.
- Clark J.R., Moore J.N., Lopez-Medina J., Perkins-Veazie P. and Finn C.E. (2005). 'Prime Jan' (APF-8) and 'Prime-Jim' (APF-12) primocane-fruiting blackberries. *HortScience* 40:852-855.
- Clark J.R., Stafne E.T., Hall H. K., Finn C.E. (2007). Blackberry breeding and genetics. *Horticultural Reviews* Vol. 33, 2:78-79.
- Clark John R. and Finn Chad E. (2014). Blackberry cultivation in the world. *Rev. Bras. Frutic.* 36 (1).

- Clark, J. R. (2005). Changing times for eastern United States blackberries. *HortTechnology* 15:491-494.
- Clark, J. R. and Finn C. E. (2008). New Trends in Blackberry Breeding. *Acta Hort.* 777: 41-47.
- Corbesier L., Vincent C., Jang S., Fornara F., Fan Q., Searle I., Giakountis A., Farrona S., Gissot L., Turnbull C. et al. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030–1033.
- De Faria M.J.S.S., Donnelly D.J., Cousineau J.C. (1997). Adventitious shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of red raspberry. *Braz Arch Biol Technol* 40:518–529.
- Denoyes B., Gaston A., Rothan C. (2020). Make it bloom! *CONSTANS* contributes to day neutrality in rose. *Journal of Experimental Botany* 71: 3923–3926.
- Ellis M.A., Converse R.H., Williams R.N. and Williamson B. (1991). *Compendium of raspberry and blackberry diseases and insects*. APS Press, St. Paul, Minn.
- Finn C.E. (2008). Blackberries. In: Hancock JF (ed) *Temperate fruit crop breeding*. Springer, Berlin, pp 83–114.
- Finn C.E., Hancock J.F. (2008). Raspberries. In: Hancock J.F. (ed) *Temperate fruit crop breeding*. Springer, Berlin, pp 359–392.
- Fiola J.A., Hassan M.A., Swartz H.J., Bors R.H., McNicols R. (1990). Effect of thidiazuron, light, fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 20:223–228.
- Flachowsky H., Hanke M.V., Peil A., Strauss S.H. and Fladung M. (2009). A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. *Plant Breed*, 128: 217-226.
- Gajdošová A., Ostrolucká M.G., Libiaková G., Ondrušková E. and Šimala D. (2006). Microclonal propagation of *Vaccinium* sp. and *Rubus* sp. and detection of genetic variability in culture in vitro. *J Fruit Ornament Plant Res* 14, (Suppl.1): 61-76.

- Gajdošová A., Vujović T., Súkeníková M., Libiaková G. (2015). Improvement of adventitious organogenesis for regeneration of transgenic plants in blackberry-Genetika, Vol 47, No. 2, 599-608.
- Gaston A., Potier A., Alonso M., Sabbadini S., Delmas F., Tenreira T., Cochetel N., Labadie M., Prévost P., Folta K. M., Mezzetti B., Hernould M., Rothanand C. and Denoyes B. (2021). The FveFT2 florigen/FveTFL1 antiflorigen balance is critical for the control of seasonal flowering in strawberry while FveFT3 modulates axillary meristem fate and yield. *New Phytologist*, 232:372–387.
- Georgieva M., Kondakova V., Djilyanov D., Badjakov I., Yancheva S. (2008). Genetic transformation of raspberries by means of *Agrobacterium tumefaciens*. *Analele Universitatii din Craiova, seria Biologie, Horticultura, Tehnologia Prelucrarii Produselor Agricole, Ingineria Mediului*, vol. XIII (XLIX): 5-14.
- Graham J., Iasi L. and Millam S. (1997). Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 48: 167-173.
- Graham J., McNicol R.J. (1990). Plantlet regeneration and genetic transformation in soft fruit species. *Acta Hort.* 280:517-523.
- Gupta S. and Mahalaxmi V. (2009). In vitro high frequency direct plant regeneration from whole leaves of blackberry. *SciHort*, 120: 22-26.
- Guzmán-Baeny T.L. (2003). Incidence, distribution, and symptom description of viruses in cultivated blackberry (*Rubus* subgenus *Rubus*) in the southeastern United States. M.S. Thesis, North Carolina State.
- Hassan M.A., Swartz H.J., Inamine G., Mullineaux P. (1993). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of several *Rubus* genotypes and recovery of transformed plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 33:9–17.
- Heide O.M., Stavang J.A., Sonstebj A. (2013). Physiology and genetics of flowering in cultivated and wild strawberries - a review. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 88:1–18.
- Hicks G.S. (1980). Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot. Rev.* 46: 1-23.
- Iocoli Lucia. Ottimizzazione di protocolli di micropropagazione e rigenerazione in vitro di due varietà di mora (*Rubus fruticosus* L.). Tesi di laurea (2020-21), UNIVPM.

- Jihong Tan, Lili Lin, Haiyan Luo, Shengjun Zhou, Yuqiang Zhu, Xin Wang, Li Miao, Huasen Wang and Peng Zhang. (2022) Recent Progress in the Regeneration and Genetic Transformation System of Cucumber. *Appl. Sci.* 12(14), 7180
- Kokko H. e Kärenlampi S.O. (1998). Transformation of Arctic Bramble (*Rubus arcticus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 17:822-826.
- Lawlor D.W. (2013). Genetic engineering to improve plant performance under drought: physiological evaluation of achievements, limitations, and possibilities. *Journal of experimental botany*, 64(1): 83- 108.
- Lazić T. and Ružić Đ. (2007): Organogenesis in vitro from the leaf of blackberry cv. 'Čačanska bestrna'. *Genetika*, 39:69- 78.
- Lifschitz E., Ayre B.G., Eshed Y. (2014). Florigen and anti-florigen - a systemic mechanism for coordinating growth and termination in flowering plants. *Frontiers in Plant Science*5: 465.
- Lifschitz E., Eshed Y. (2006). Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* 57: 3405–3414.
- Lim, Y.K. and Knight, V.H. (2000). The successful transfer of primocane fruiting expression from raspberry to *Rubus* hybrid berry. *Euphytica* 116:257-263.
- Lopez-Medina J., Moore J.N. and McNew R.W. (2000). A proposed model for inheritance of primocane fruiting in tetraploid erect blackberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 125:217-221.
- M. Diemoz. (2013). *Manuale tecnico pratico. La coltivazione del lampone.* Institut Agricole Régional.
- M. Zia-Ul-Haq, M. Riaz, V. De Feo, Hawa Z. E. Jaafar and M. Moga. (2014). *Rubus Fruticosus L.: Constituents, Biological Activities and Health Related Uses.* Molecules.
- Martin, R.R., Tzanetakis, I.E., Gergerich, R., Fernandez, G.E. and Pesic, Z. (2004). Blackberry yellow vein associated virus: A new crinivirus found in blackberry. *ActaHort.* 656:137-142.
- Mathews H., Wagoner W., Cohen C., Kellog J., Bestwick R. (1995). Efficient genetic transformation of red raspberry, *Rubus ideaus* L. *Plant Cell Rep* 14:471–476.
- McGarry R.C., Ayre B.G. (2012). Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Science*188–189:71–81.

- McNicol R.J., Graham J. (1989). *Acta Hort.* 262:41–46.
- Meng R.G., Chen T.H.H., Finn C.E. and Li Y. (2004): Improving in vitro regeneration from leaf and petiole explants of ‘Marion’ blackberry. *HortSci*, 39: 316-320.
- Mezzetti B., Landi L., Pandolfini T. and Spena A. (2004). The DefH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnik* 4:1–10.
- Mezzetti B., Landi L., Phan H.B., Mantovani I., Ruggieri S. and Rosati P. (1999). Protoplast technology and regeneration studies for *Rubus* breeding. *Acta Hort.*, 505: 215-222.
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O. and Landi L. (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera* via organogenesis. *BMC Biotechnology*, 2:18.
- Mezzetti B., Savini G., Carnevali F. and Mott D. (1997). Plant genotype and growth regulators interaction affecting in vitro morphogenesis of blackberry and raspberry. *Biol Plant*, 39: 139-150.
- Microbiologiaitalia.it
- Moore J.N., Skirvin R. M. (1990). Blackberry management. *Small Fruit Crop Management*. 214-244.
- Moore, J.N. (1984). Blackberry breeding. *HortScience* 19:183-185.
- Moraes T.S., Dornelas M.C., Martinelli A.P. (2019). FT/TFL1: calibrating plant architecture. *Frontiers in Plant Science*10: 97.
- Navarro C., Abelenda J.A., Cruz-Oro E., Cuellar C.A., Tamaki S., Silva J., Shimamoto K. and Prat S. (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* 478: 119–122.
- Neumann E., Schäfer-Ridder M., Young Y., Hofschneider P.H. (1982) *EMBO J.* 1:841–845.
- Palonen P. and Buszard D. (1998). In vitro screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 53: 213-216.
- Park S.J., Jiang K., Tal L., Yichie Y., Gar O., Zamir D., Eshed Y. and Lippman ZB. (2014). Optimization of crop productivity in tomato using induced mutations in the florigen pathway. *Nature Genetics* 46: 1337–1342.
- Perilleux C., Bouche F., Randoux M., Orman-Ligeza B. (2019). Turning meristems into fortresses. *Trends in Plant Science*24: 431–442.

- Phan H.B., Landi L., Taruschio L., Daniela Mott, Mezzetti B. e Rosati P. (1997). Protoplasts isolation, culture and cell differentiation for raspberry and blackberry cultivars (*Rubus* spp.). *Angew. Bot.*, 71:131-137.
- Pin P.A., Nilsson O. (2012). The multifaceted roles of FLOWERING LOCUS T in plant development. *Plant, Cell & Environment* 35: 1742–1755.
- Rantanen M., Kurokura T., Mouhu K., Pinho P., Tetri E., Halonen L., Palonen P., Elomaa P., Hytonen T. (2014). Light quality regulates flowering in FveFT1/FveTFL1 dependent manner in the woodland strawberry *Fragaria vesca*. *Frontiers in Plant Science* 5: 271.
- Rotino G.L., Perri E., Zottini M., Sommer H., Spena A. (1997). Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nat Biotechnol*, 15:1398-20.
- Shalit A., Rozman A., Goldshmidt A., Alvarez J.P., Bowman J.L., Eshed Y., Lifschitz E. (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 8392–8397.
- Soyk S., Muller N.A., Park S.J., Schmalenbach I., Jiang K., Hayama R., Zhang L., Van Eck J., Jimenez-Gomez J.M., Lippman Z.B. (2017). Variation in the flowering gene SELF PRUNING 5G promotes day-neutrality and early yield in tomato. *Nature Genetics* 49: 162–168.
- Ssekya C. and Muwanga M.K., (2009). Biotechnology in Organic Agriculture in Africa: Myth or Oversight. *Journal of Science and Sustainable Development*, 2(1): 33-38.
- Súkeníková M., Libiaková G., Moravčíková J., Hricová A., Gajdosová A. (2015). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of blackberry (*Rubus fruticosus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 120:351–354.