



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**PROTOCOLLI DI RIGENERAZIONE E
TRASFORMAZIONE GENETICA PER L'INDUZIONE
DI RESISTENZA A BOTRYTIS CINEREA E
PHYTOPHTHORA INFESTANS CON COSTRUTTI
ESPRIMENTI PEPTIDI ANTIMICROBICI E
MOLECOLE RNAi NEL PORTINNESTO DI
POMODORO BEAUFORT**

**REGENERATION AND GENETIC TRANSFORMATION
PROTOCOLS FOR THE INDUCTION OF RESISTANCE TO
BOTRYTIS CINEREA AND PHYTOPHTHORA INFESTANS WITH
CONSTRUCTS EXPRESSING ANTIMICROBIAL PEPTIDES AND
RNAi MOLECULES IN THE BEAUFORT TOMATO ROOTSTOCK**

TIPO TESI: sperimentale

Studente:
GIULIO LEOPARDI DITTAJUTI

Relatore:
DOTT.SSA SILVIA SABBADINI

Correlatore:
DOTT.SSA MARIA VICTORIA SUNICO
SANCHEZ
DOTT.SSA VALERIA PERGOLOTTI

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

*“La terra, come la vita, richiede pazienza e dedizione.
Non sempre vediamo subito i frutti del nostro lavoro,
ma sappiamo che ogni seme, se curato con costanza,
germoglierà al suo tempo.
‘Il mondo è cambiamento; la vita è giudizio.
Quello che oggi semini, domani raccoglierai.
E ciò che non coltivi, domani verrà perduto’.
– Marco Aurelio*

Con gratitudine alla mia famiglia,
che mi ha insegnato, come nella cura della terra,
a coltivare con pazienza e amore i sogni e i valori più preziosi.

Ai miei relatori e correlatori,
al dipartimento di frutticoltura e arboricoltura del D3A-UNIVPM,
che con la loro guida sapiente
mi hanno ispirato a cercare con perseveranza e a non temere l'incertezza,
va la mia più sincera riconoscenza.
*"La ricerca è un dialogo silenzioso con l'ignoto,
una danza tra domande e risposte che illumina il cammino della conoscenza."*

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE	5
ELENCO DELLE FIGURE.....	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI.....	8
INTRODUZIONE	10
CAPITOLO 1 CARATTERISTICHE GENERALI DEL POMODORO.....	10
1.1 Storia, origine e diffusione	10
1.2 Inquadramento botanico ed ecofisiologico.....	11
1.3 Ruolo del pomodoro in agricoltura con focus sull'Italia: pomodoro da mensa e da industria	12
1.4 Modalità di propagazione pomodoro da mensa e da industria, miglioramento genetico, diritti di propagazione e royalties.....	14
1.5 Principali fitopatie del pomodoro, in particolare <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Phytophthora infestans</i> e impatto sulle produzioni	16
1.6 Trattamenti fungicidi su pomodoro contro <i>Botrytis cinerea</i> e <i>Phytophthora infestans</i> , conseguenti impatti ambientali e sulla salute dei consumatori in relazione ai principi del Green Deal europeo	17
1.7 Approcci biotecnologici alternativi all'uso di fitofarmaci.....	18
1.7.1 Innesto del pomodoro (resistenza/tolleranza a patogeni).....	20
1.7.2 Resistenza in pianta indotta attraverso le tecniche di ingegneria genetica: biotecnologie genetiche applicate al pomodoro.....	22
1.7.2.1 Ingegneria genetica e OGM	23
1.7.2.2 Geni marcatori e geni reporter.....	25
1.7.2.3. RNA interference (RNAi) e cross kingdom RNAi	26
1.7.2.4 Combinazione tecniche di ingegneria genetica ed innesto per induzione di resistenza su marza (Transgrafting).....	29
1.7.3 Espressione stabile di peptidi antimicrobici e costrutti RNAi	30
1.7.4 Applicazione esogena di peptidi antimicrobici e dsRNA (SIGS).....	32
CAPITOLO 2 SCOPI.....	34
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI.....	35
3.1 Materiale vegetale.....	35
3.1.1. Materiale vegetale per la sterilizzazione semi, germinazione e micropropagazione del pomodoro selvatico Beaufort	35
3.1.2. Materiale vegetale prove di trasformazione e rigenerazione	39
3.2 Composti chimici utilizzati.....	40
3.3 Substrati di coltura	41

3.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : ceppi, vettori e agenti selettivi.....	45
3.5 Protocollo di rigenerazione e trasformazione	49
3.6 Selezione del materiale trasformato e screening molecolare mediante analisi PCR.....	55
3.7 Rilevazione e analisi dati.....	57
3.7.1 Analisi statistica	58
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONI	60
4.1 Sterilizzazione e germinazione semi.....	60
4.2 Micropropagazione in vitro	62
4.3 Prove di trasformazione	66
4.4 Prove di rigenerazione.....	75
4.5 Risultati della trasformazione mediante analisi molecolare PCR ed elettroforesi	77
CAPITOLO 5 CONCLUSIONI.....	80
BIBLIOGRAFIA	87
SITOGRAFIA.....	94

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Substrato utilizzato per la proliferazione e radicazione.....	41
Tabella 2: Terreno impiegato nella prima fase di rigenerazione	42
Tabella 3: Terreni impiegati nelle varie fasi di trasformazione.....	43
Tabella 4: Terreni di crescita batterica.....	44
Tabella 5: Terreni di rigenerazione, selezione e accrescimento dei germogli trasformati	44
Tabella 6: Confronto della contaminazione da <i>A. tumefaciens</i> su espianti trasformati con i costrutti Inteina, CP20 e Bc DCL1/2, dopo l'applicazione di tre protocolli differenti (dicembre 2023, marzo 2024, maggio 2024) nel corso di sei settimane	68

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Riassunto grafico dei meccanismi molecolari che avvengono nelle piante innestate (Tsaballa et al., 2021).....	21
Figura 2: Illustrazione del meccanismo di silenziamento genico mediato da RNAi (RNAi-Mediated Gene Silencing) (Taning et al., 2021).....	27
Figura 3: I due principali approcci biotecnologici basati sulla tecnologia RNAi per il controllo delle fitopatie nelle piante (Taning et al., 2020).....	29
Figura 4: Schematizzazione semina di semi Beaufort in piastra Petri su terreno di coltura MS0 al giorno 036	
Figura 5: Espianti di portinnesto di pomodoro con gemme apicali o ascellari appena trasferiti in vitro su terreno MS0.....	37
Figura 6: Tunnel con telo in plastica all'interno della serra, dove è stato fatto l'ambientamento.....	39
Figura 7: Plasmide pBIN19SP-2XFYVE-3XFLAG-Intein-CP20 esprime il peptide antimicrobico CP20 ingegnerizzato all'interno del ceppo di <i>A. tumefaciens</i> EHA105	46
Figura 8: Cassetta genica del costrutto 35S::Intein-CP20.....	47
Figura 9: Plasmide phellsgate8 esprime le molecole RNAi (Bc DCL 1/2) per il silenziamento genico, ingegnerizzato in <i>A. tumefaciens</i> ceppo GV301	48
Figura 10: Cassetta genica del costrutto 35S::Bc-DCL 1/2	48
Figura 11: Schema del processo di rigenerazione (organogenesi) di piante in vitro (in <i>Arabidopsis</i>) (Lee et al., 2024)	50
Figura 12: Fasi di coltura delle colonie batteriche e preparazione dell'inoculo: A) Coltura dei ceppi EHA 105 e GV301 di <i>A. tumefaciens</i> con i relativi costrutti su piastra dopo 48 di incubazione; B) Inoculo batterico; C) Lettura spettrofotometrica per verificare la crescita del batterio (OD); D) Pellettizzazione in seguito a centrifugazione e decantazione	52
Figura 13: Espianti fogliari posti su terreno di rigenerazione e selezione LRSM (A) dopo le 48 ore di coltura, subito dopo il lavaggio e l'asciugatura con filtri di carta sterili.....	54
Figura 14: A) Fase di sterilizzazione in baker con NaClO al 5% in 200 ml di acqua deionizzata: B) serie di lavaggi in Falcon con acqua deionizzata per 10, 5 e 1 minuti)	60
Figura 15: Schematizzazione germinazione semi Beaufort (10/Petri) dopo 0, 1, 2 e 6 giorni dalla semina su substrato MS0 in Petri	61
Figura 16: Tasso di germinazione semenzali Beaufort in Petri su terreno di coltura MS0 in diversi giorni post semina.....	62

Figura 17: Tasso di proliferazione Beaufort (cicli di subcoltura di due settimane, 2,6 espianti in media per pianta; 10 espianti/vaso)	63
Figura 18: Fasi micropropagazione del portinnesto di pomodoro Beaufort (con gemme apicali ed ascellari) in vitro, particolare inizio proliferazione (A) (1 giorno dopo il trasferimento); allungamento parte aerea (B) e sviluppo radicale (C) (dopo 9 giorni dall'inizio della proliferazione)	65
Figura 19: Inizio radicazione dei germogli apicali e ascellari dopo l'inizio della subcoltura, dall'inizio della proliferazione	66
Figura 20: Dinamica di evoluzione degenerativa di un callo meristemico derivante da espianto fogliare trattato con CP20, su terreno LRSM in diversi periodi di tempo dopo l'infezione: A) 1 mese; B) 2 mesi; C) 3 mesi; D) 4 mesi (necrotico).....	69
Figura 21: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto Inteina.....	71
Figura 22: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto CP20.....	72
Figura 23: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto a RNAi Bc DCL1/2	73
Figura 24: Confronto percentuale di callogenesi tra Inteina e CP20	75
Figura 25: Organogenesi di un callo meristemico derivante da espianto fogliare infettato con il costrutto Inteina: inizio della differenziazione (A); la formazione delle prime strutture del germoglio rigenerato (B); proliferazione del germoglio rigenerato (C).....	77
Figura 26: Elettroforesi su gel di agarosio al 1% dei prodotti PCR per la verifica dell'integrazione del costrutto genico Inteina portante il gene nptII in germogli ottenuti tramite organogenesi da callo di espianto fogliare trasformato con <i>A. tumefaciens</i> . La prima riga si riferisce alla PCR con Phire Tag, la seconda riga a quella con Green master mix: Marcatore di peso molecolare o "ladder": 1 kb; M1 e M3) Diluizione seriale del campione a 1/2; M2 e M4) Diluizione seriale del campione 1/10 ; M3 e M5) Diluizione seriale del campione 1/30; Neg) Campione negativo Phire Tag e Green Master Mix: il controllo negativo non contiene DNA bersaglio ma solamente i reagenti; Pos: il controllo positivo è un campione che contiene il frammento di DNA bersaglio amplificato dalla PCR (nptII - 540 pb).....	79

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

A.TUMEFACIENS	<i>Agrobacterium Tumefaciens</i>
AMPs	Antimicrobial Peptides (Peptidi Antimicrobici)
B.CINEREA	<i>Botrytis Cinerea</i> (Botrite)
BAP	benziladenina
CIM	Callus Induction Medium (terreno di induzione dei calli)
ckRNAi	cross-kingdom RNAi
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dsRNA	double-stranded RNA (RNA a doppio filamento)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	<i>β-glucuronidasi</i>
HIGS	Host Induced Gene Silencing (silenziamento genico indotto dall'ospite)
IAA	acido indol-3-acetico
IPM	Integrated Pest Management (Gestione integrata dei parassiti)
LB	Luria-Bertani
LRSM	Linsmaier and Skoog Medium
MAS	Marker-Assisted Selection (Selezione Assistita da Marcatori)
mRNA	messenger RNA – RNA messaggero
MS0	Murashige and Skoog medium (MS) without hormones
NPTII	<i>neomicina fosfotransferasi II</i>
OGM	Organismi Geneticamente Modificati
P.INFESTANS	<i>Phitophthora Infestans</i> (Peronospora della patata e del pomodoro)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reazione a Catena della Polimerasi)
PGR	Plant Growth Regulators (regolatori di crescita delle piante)
QTL	Quantitative Trait Loci (Loci di Tratti Quantitativi)

R&D	Research and Development Department (Dipartimento di Ricerca e Sviluppo)
RIM	Root Induction Medium (terreno di induzione delle radici)
RISC	RNA-induced silencing complex (complesso di silenziamento indotto da RNA)
RNAi	RNA Interference (RNA Interferente)
ROS	Reactive Oxygen Species (specie reattive dell'ossigeno)
SIGS	Spray-Induced Gene Silencing (silenziamento genico indotto da spray)
SIM	Shoot Induction Medium (terreno di induzione dei germogli)
siRNA	small interfering RNA (piccoli RNA interferenti)
T-DNA	Transfer DNA (DNA di trasferimento)
TWSV	Tomato Wilt Spotted Virus
TYLCV	Tomato Yellow Leaf Curl Virus
UE	Unione Europea

INTRODUZIONE

Capitolo 1

CARATTERISTICHE GENERALI DEL POMODORO

1.1 Storia, origine e diffusione

Il pomodoro, *Solanum lycopersicon* ($2n=24$) rappresenta una delle coltivazioni più diffuse e importanti a livello mondiale, sia dal punto di vista economico che alimentare. Originario delle regioni tropicali dell'America Latina, il pomodoro ha subito nel corso dei secoli un processo di selezione naturale e di miglioramento genetico che ne hanno aumentato la resa, migliorato la qualità e adattato le caratteristiche alle esigenze agronomiche e di mercato. Oltre a questo, il miglioramento genetico del pomodoro ha giocato un ruolo cruciale nel garantire una maggiore resistenza alle malattie, una migliore conservabilità ed una diversificazione delle caratteristiche qualitative, come il sapore, la consistenza ed il colore.

Il pomodoro appartiene alla famiglia delle Solanacee, catalogato da Linneo come genere *Solanum*, in seguito rinominato da Miller con il nome di *Lycopersicon*, con l'introduzione di due sottogeneri: *Eulycopersicon* C.H. Mull (frutti rossi e glabri) ed *Eryopersicon* C.H. Mull (frutti verdi e tomentosi). Il sottogenere *Eulycopersicon* contiene le specie *L. pimpinellifolium* Mill. e la specie *L. esculentum* Mill., che attualmente è la specie più coltivata ai fini agronomici e produttivi.

La famiglia delle Solanaceae comprende oltre 3000 specie, originarie sia del Vecchio (Asia) che del Nuovo Mondo (America centrale e meridionale). Questo gruppo botanico si è differenziato relativamente di recente, circa 7 milioni di anni fa, e si è successivamente diffuso lungo la costa Ovest dell'America Latina. Nonostante esistano prove tangibili sull'origine geografica delle specie selvatiche affini, si rimane incerti sul luogo esatto della domesticazione del pomodoro. Coesistono diverse teorie, ma la principale suggerisce il Messico meridionale, supportata da evidenze culturali, linguistiche, storiche e genetico-molecolari (Angelini, 2010).

Anche se ancora non si è giunti a una conclusione definitiva riguardo all'origine geografica del pomodoro coltivato, si ritiene che il suo genotipo sia in gran parte derivato dalle forme spontanee di *S. lycopersicum* var. cerasiforme, con contributi da *S. pimpinellifolium*, attraverso fenomeni di introgressione genetica.

Il processo di adattamento di una specie allo stato coltivato, noto come “sindrome di domesticazione”, è stato guidato dalla selezione umana, che ha favorito specifiche variazioni genetiche, come ad esempio il cambiamento

di colore delle bacche che sono passate da verdi a rosse, per una mutazione detta monofiletica e dunque avvenuta una sola volta durante l'evoluzione della specie.

1.2 Inquadramento botanico ed ecofisiologico

Oltre alle specie coltivate di *S. lycopersicum* e alla sua forma selvatica *S. esculentum* var. cerasiforme, ci sono otto specie selvatiche correlate, tra cui *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. chmielewskii*, *S. chilense*, *S. parviflorum*, *S. peruvianum*, *S. hirsutum* e *S. penelli* (Foolad, 2007).

Le piante afferenti alla specie *S. lycopersicum* sono classificate erbacee perenni, anche se nei climi temperati viene coltivata con approccio annuale. L'habitus di crescita può essere eretto o prostrato, a seconda della cultivar e destinazione agronomica. L'apparato radicale ha struttura fibrosa e fascicolata, può raggiungere una profondità di 1,5 m, sebbene la maggior densità radicale si riscontri nei primi 60 – 70 cm.

Le foglie (lunghe circa 20–30 cm) sono generalmente composte e pennate, con 7–11 foglioline. Sia le foglie che il fusto sono caratterizzati da forte tomentosità e questi peli secernono sostanze responsabili del caratteristico odore di pomodoro.

Il fusto può presentare sviluppo indeterminato (monopodiale), quando il suo meristema apicale mantiene per tutta la vita della pianta la capacità di formare foglie e infiorescenze all'ascella di quest'ultime; in altri casi lo sviluppo viene detto determinato (simpodiale), cioè la gemma apicale ad un certo punto del ciclo fisiologico si trasforma in infiorescenza e nuovi germogli si sviluppano all'ascella delle foglie precedentemente formate, sicché la pianta assume portamento più prostrato e taglia contenuta.

La struttura florale, grazie alle caratteristiche morfologiche, favorisce l'autogamia o autoimpollinazione. I fiori si formano in numero variabile da 4 a 12 su infiorescenze a racemo che sorgono all'ascella delle foglie. Questi sono gialli, bisessuati, con ovario supero pluriloculare e pluriovulare, gli stami sono in numero di cinque o più, e formano con le antere un manicotto intorno al pistillo.

Il frutto è botanicamente considerato una bacca, costituito da semi all'interno di un pericarpo carnoso derivante dall'ovaio. Il numero di carpelli nei fiori corrisponde direttamente al numero di loculi nei frutti. La composizione del frutto del pomodoro è caratterizzata dalla presenza del 93-97% di acqua, mentre la sostanza secca è composta principalmente da zuccheri (40–60%), proteine e aminoacidi (15–20%), acidi organici (4–10%), minerali (in particolare potassio), vitamine e pigmenti (vitamina A, C, licopene e beta-carotene), sostanze insolubili (cellulosa, emicellulosa e pectine). I semi sono ruvidi, appiattiti e discoidali, con 1000 semi del peso di 2,5–3,5 g (Angelini, 2010).

Da una prospettiva eco fisiologica, la temperatura minima letale è 0-2 °C, la temperatura critica di crescita è 10-12 °C, la temperatura per la formazione dei fiori è 14 -16 °C, la temperatura ottimale di crescita è 24-26 °C. Temperature superiori ai 32-34 °C inibiscono la crescita e la maturazione delle bacche. I frutti, inoltre, sono molto sensibili alla radiazione, e le bruciature sono un danno molto comune soprattutto in alcune varietà

scarsamente dense a livello di chioma (foglie poco articolate), tanto questa tipologia di danni da bruciatura rientrano tra le caratteristiche qualitative considerate nella commercializzazione del prodotto fresco (da mensa) per il mercato interno.

Relativamente alla struttura del terreno, il pomodoro è una pianta piuttosto resiliente, e può prosperare sia in terreni sciolti che argillosi. Per quanto riguarda il pH del suolo, preferisce un ambiente da sub acido a sub alcalino, con valori compresi tra 6,5 e 7,5.

Le esigenze nutrizionali risultano moderatamente alte se si vuole garantire una buona produzione. La carenza di azoto, ad esempio, può causare una condizione di squilibrio che porta a marciume apicale e deformazione dei frutti, nota come "monkey face"; in questa situazione di stress nutrizionale, possono anche essere coinvolte carenze di calcio e boro. In alcuni casi, soprattutto nelle coltivazioni in serra, si applicano trattamenti fogliari con cloruro di calcio per contrastare tali carenze.

La pianta ha una certa tolleranza alla salinità e allo stress idrico, grazie al suo sistema radicale ben sviluppato e ramificato. Tuttavia, per ottenere produzioni costanti e significative, soprattutto nelle regioni mediterranee, è altamente consigliabile l'irrigazione, preferibilmente a goccia.

L'intero ciclo colturale dura dai 140 ai 170 giorni a seconda del tipo di sviluppo, delle condizioni di coltivazione e della cultivar. L'ambiente ottimale per il pomodoro si riscontra nelle regioni di provenienza e in quelle temperato-calde, con un optimum termico diurno di 22-26 °C. Temperature superiori a 30-35°C influiscono negativamente sull'allegagione, sulla formazione del licopene e sulla pigmentazione delle bacche.

1.3 Ruolo del pomodoro in agricoltura con focus sull'Italia: pomodoro da mensa e da industria

Il pomodoro ha un'importanza centrale nell'economia dei prodotti orticoli in Europa e nel mondo. Basti pensare che, in Europa, il pomodoro rappresenta l'ortaggio più coltivato sia per la produzione fresca che per la trasformazione. La destinazione agronomica del prodotto è infatti un criterio chiave anche nella scelta della cultivar, in quanto si distinguono varietà da pomodoro da mensa (fresco), da industria (preparazione di concentrati, pelati e succo) e da serbo.

L'Italia è il primo produttore europeo di pomodoro con 6.6 milioni di tonnellate e oltre 6 miliardi di euro di fatturato. (FAO STAT, 2021).

La produzione di pomodoro in Italia ha una lunga tradizione e rappresenta una componente significativa dell'economia agricola nazionale, rappresentando uno degli ortaggi più importanti della filiera ortofrutticola ed elemento di punta del nostro settore agroalimentare. Inoltre, è da sottolineare l'importanza culturale che questo ortaggio riveste in Italia, in quanto dalla sua prima importazione dalle Americhe è diventato con il tempo una coltura fondamentale sia in campo che per innumerevoli ricette gastronomiche tipiche.

Attraverso un processo di domesticazione e selezione molto frammentato e diversificato, più o meno volontario, avvenuto nelle diverse regioni, soprattutto del sud Italia, sono nate varietà uniche e diversificate come ad esempio il pomodoro San Marzano, il Datterino, il Ciliegino ed il Cuore di bue.

Il pomodoro da industria rappresenta una fetta importante dell'export agroalimentare italiano, oltre che essere la base di buona parte della cucina italiana, mentre il pomodoro da mensa contribuisce prevalentemente al mercato interno e alla dieta mediterranea.

Le varietà utilizzate per la mensa possono essere sia a crescita determinata (ordinariamente a ciclo breve e maturazione contemporanea) sia a crescita indeterminata (ordinariamente a ciclo lungo e maturazione scalare). Secondo i dati FaoStat, nell'UE la produzione di pomodori per il mercato fresco si aggira su 7 mln di tonnellate, di cui circa 1 mln vengono prodotti in Italia (600.000 t in piena aria e 400.000 t in coltura protetta). La regione più importante per la produzione di pomodoro da mensa è la Sicilia, che da sola ricopre il 25% delle produzioni nazionali in pien' aria. In coltura protetta la Sicilia produce 91.000 t, seguita dalla Campania (oltre 74.000 t) e dalla Sardegna (61.000 t). Le varietà più comuni includono il pomodoro ciliegino, il pomodoro tondo liscio, il pomodoro costoluto e il pomodoro a grappolo. La produzione avviene quindi principalmente in campo ma anche in serra, con una particolare attenzione alla qualità del frutto, che deve essere visivamente accattivante (senza difetti), saporito e resistente durante le fasi di conservazione e di trasporto. La coltivazione in serra permette di controllare meglio le condizioni ambientali (luce, temperatura, umidità e CO₂), riducendo l'incidenza di malattie e parassiti, attraverso lo sfruttamento di sensori e sistemi di riscaldamento, aerazione e ombreggiamento, molto spesso controllati da una centralina dotata di interfaccia digitale. La fertirrigazione e l'uso di substrati inerti come, ad esempio, la fibra di cocco, sono pratiche comuni per ottimizzare la crescita delle piante, la qualità dei frutti e ridurre gli impatti ambientali derivanti da un sovrasfruttamento del suolo e dall'uso di fitofarmaci e fertilizzanti azotati.

Il pomodoro da industria è destinato invece alla trasformazione in prodotti come passata, pelati, concentrato e salse. Le varietà utilizzate sono selezionate per la loro elevata resa, resistenza alle malattie e compatibilità con le macchine per la raccolta meccanica. Tra le varietà più coltivate vi sono il San Marzano, il Roma e il Hybrid.

La coltivazione del pomodoro da industria si svolge prevalentemente in campo aperto, con un'elevata meccanizzazione delle operazioni di semina, cura e raccolta. La produzione totale in Italia nel 2023 si assesta intorno a 5 mln di t in pien'aria e 18 700 t in coltura protetta (Istat, 2023).

Pratiche come l'irrigazione a goccia e la gestione integrata dei parassiti (IPM) sono ad oggi tecniche fondamentali per garantire una produzione sostenibile e di alta qualità, soprattutto in ottica ambientale. La coltivazione intensiva del pomodoro in pieno campo comporta sfide legate all'uso delle risorse idriche, ai trattamenti fitosanitari e alla gestione dei residui agricoli e, pertanto, garantire la sostenibilità a lungo termine della produzione di pomodoro è fondamentale, per prima cosa attraverso l'applicazione di pratiche agronomiche sostenibili come l'uso di varietà resistenti, la rotazione delle colture e l'agricoltura di precisione.

1.4 Modalità di propagazione pomodoro da mensa e da industria, miglioramento genetico, diritti di propagazione e royalties

La propagazione del pomodoro avviene principalmente per seme, sebbene sia possibile anche la propagazione vegetativa, meno adoperata, tramite innesto, talea e anche micropropagazione.

La propagazione per seme viene effettuata sia in vivaio che direttamente in campo, attraverso la semina in contenitori con substrato sterile per evitare malattie terricole, e dopo la germinazione e l'iniziale crescita, le piantine vengono trapiantate in campo o in serra dopo circa 4-6 settimane. La selezione e la qualità del seme è cruciale per garantire una germinazione uniforme e una crescita vigorosa delle piante; perciò, è fondamentale l'utilizzo di semente certificata e da fonti accreditate.

La propagazione per talea è meno comune ma può essere utilizzata per mantenere le caratteristiche genetiche di varietà particolarmente pregiate. Le talee vengono prelevate da piante madri sane e vigorose. Le porzioni prelevate sono generalmente apicali, lunghe circa 10-15 cm, e devono includere almeno due nodi; successivamente vengono poste in diverse tipologie di substrato umido fino allo sviluppo di un apparato radicale adeguato.

Un'altra tecnica utilizzata, sebbene di più recente diffusione, è l'innesto. L'innesto è una pratica biotecnologica antica che viene attualmente praticata principalmente per migliorare la resistenza delle piante a malattie del suolo e per aumentare la produttività e consiste nell'unire la parte superiore (marza) di una pianta con un apparato radicale (portainnesto) di un'altra varietà, selezionata per i caratteri di interesse da trasferire al nesso. Portinnesti e marze vengono comunque, generalmente, ottenuti a partire da semenzali certificati seminati e germinati in vivaio. I programmi di miglioramento genetico per il pomodoro sono oggi prevalentemente gestiti da aziende private che operano per ottenere nuove varietà adatte alle diverse destinazioni di mercato e si utilizzano principalmente tecniche tradizionali di incrocio, come l'ibridazione e l'autofecondazione, per sviluppare nuove cultivar. In integrazione a queste tecniche, viene spesso impiegata la selezione in vivo assistita da marcatori molecolari, che permette di identificare e selezionare in modo più efficiente le piante con le caratteristiche desiderate.

In particolare, con l'ibridazione si attua l'incrocio o crossing di due piante geneticamente diverse per combinare caratteristiche desiderabili da entrambe. Questo approccio permette di ottenere ibridi, in cui viene migliorata la vigoria e la produttività sfruttando il fenomeno dell'eterosi. Gli ibridi F1 sono molto comuni per le diverse varietà di pomodoro in commercio per le loro qualità superiori. L'autofecondazione, invece, viene utilizzata per "fissare" le caratteristiche desiderabili nelle linee pure. Si sfrutta il fenomeno dell'impollinazione in modo più o meno naturale (di facile applicazione in pomodoro grazie all'autogamia) e consiste nella fecondazione della stessa pianta per diverse generazioni, fino a ottenere una linea geneticamente stabile e uniforme, detta appunto linea pura.

Alle tecniche di selezione in vivo si accompagna spesso la selezione assistita da marcatori molecolari (MAS): questa tecnica utilizza marcatori genetici associati a tratti specifici del genoma e consente di selezionare le piante

già nelle prime fasi di sviluppo. Questo permette a chi ne fa uso di accelerare notevolmente il processo di selezione e aumenta la precisione nella scelta delle piante con il genotipo desiderato. Questa tecnica è ormai ampiamente utilizzata ed è appurato riduca notevolmente i tempi e i costi nel processo di selezione di nuove varietà (Collard *et al.*, 2008). Il QTL Mapping identifica loci di “tratti quantitativi” (QTL) che influenzano fattori come resa, resistenza alle malattie e parametri qualitativi del frutto.

Le aziende private, solitamente grandi multinazionali, hanno istituito programmi di breeding avanzati che integrano tecniche tradizionali con le moderne biotecnologie. Queste aziende investono massicciamente in ricerca e sviluppo per mantenere un vantaggio competitivo sul mercato e tutte le nuove varietà sviluppate sono, difatti, brevettate, garantendo la protezione della proprietà intellettuale. Questo è fondamentale per le aziende private poiché protegge e giustifica i loro investimenti nel dipartimento R&D (Research and Development). Il meccanismo della brevettazione ha influenzato l'innovazione nel breeding del pomodoro, mostrando un aumento significativo del numero di varietà brevettate nel corso degli anni (Sim *et al.*, 2012).

Il settore della produzione di pomodoro, sia da mensa che da industria, è normato da un complesso sistema di diritti di proprietà intellettuale che include diritti di propagazione e royalty. Questi diritti proteggono le varietà vegetali sviluppate dai breeder (selezionatori) e garantiscono che i benefici economici derivanti dall'uso di queste varietà siano equamente distribuiti. I diritti di propagazione delle piante (Plant Breeders' Rights, PBR) sono una forma di proprietà intellettuale che concede ai breeder l'esclusiva sulle nuove varietà vegetali che hanno sviluppato e sono riconosciuti a livello internazionale dall'Unione Internazionale per la Protezione delle Nuove Varietà di Piante (UPOV). Per ottenere i diritti di propagazione una nuova varietà di pomodoro deve essere registrata presso un'autorità competente: in Italia, l'ente responsabile è il *Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MIPAAF)* ed è fondamentale che la varietà soddisfi i criteri di novità, distintività, uniformità e stabilità; in Europa si fa riferimento al CPVO (Ufficio Comunitario delle Varietà Vegetali) che rilascia brevetti per proteggere le nuove varietà vegetali nell'Unione Europea. Questo conferisce diritti esclusivi sulle nuove cultivar per un periodo temporale di 25 anni per le specie arboree e vite, e per 20 anni per le altre specie. I titolari dei brevetti possono controllare la riproduzione, il commercio, l'esportazione e l'importazione delle loro varietà.

Le royalty sono i pagamenti che devono essere effettuati per l'uso di una varietà protetta e compensano i breeder per gli investimenti fatti nello sviluppo di nuove varietà, incentivando inoltre la continua innovazione nel settore agricolo.

Possono essere calcolate in vari modi, tra cui:

- Royalty per seme: un importo fisso pagato per ogni unità di seme acquistata.
- Royalty per superficie coltivata: un importo basato sull'area coltivata con la varietà protetta.
- Royalty sul raccolto: una percentuale del valore del raccolto ottenuto utilizzando la varietà protetta.

L'uso di varietà protette è spesso regolato tramite contratti di licenza, che stabiliscono le condizioni d'uso e contemporaneamente il metodo di calcolo delle royalty. I contratti possono includere clausole relative alla qualità del seme, alle pratiche agronomiche e ai diritti di audit del titolare dei diritti.

I coltivatori beneficiano dall'accesso a nuove varietà che possono aumentare la resa e ridurre i costi di produzione ma, tuttavia, devono considerare il costo aggiuntivo delle royalty che può influire sulla complessiva redditività aziendale.

È importante che i coltivatori comprendano e rispettino i termini dei contratti di licenza per evitare sanzioni legali, poiché la gestione dei diritti di propagazione può portare a contenziosi tra breeder e coltivatori, specialmente in caso di violazione dei diritti di proprietà intellettuale, e tra coltivatori stessi per un discorso di competizione scorretta. Ad esempio, solo in Italia, negli ultimi anni, sono state diverse le segnalazioni che hanno portato a dispute legali legate alla propagazione di pomodori derivanti da talea senza pagare le dovute royalties da seme.

Oltre ai diritti di propagazione, le innovazioni genetiche e biotecnologiche nel settore del pomodoro possono essere protette da brevetti che possono dunque coprire specifiche sequenze genetiche, metodi di coltivazione o tecnologie di miglioramento delle varietà.

1.5 Principali fitopatie del pomodoro, in particolare *Botrytis cinerea* e *Phytophthora infestans* e impatto sulle produzioni

Le fitopatie rappresentano una delle principali sfide per la coltivazione del pomodoro, influenzando significativamente la produttività e la qualità del raccolto. Tra le più impattanti fitopatie fungine del pomodoro vi sono sicuramente la *Botrytis cinerea* e la *Phytophthora infestans*, meglio conosciute come muffa grigia e peronospora (in questo caso del pomodoro).

Il fungo *Botrytis cinerea* è un patogeno necrotrofo e saprofita delle piante che colonizza i tessuti vegetali e provoca muffe grigie nelle parti verdi e rammollimenti nei frutti. La *B. cinerea* si riproduce tramite conidi, che vengono dispersi dall'acqua, dal vento e dall'attività antropica. In condizioni favorevoli di alta umidità e temperature moderate (15-20°C), le sue ife possono penetrare nei tessuti vegetali attraverso ferite o aperture naturali, per poi sviluppare e diffondersi dai tessuti morti precedentemente colonizzati a quelli sani (El Oirdi, 2007). *B. cinerea* attacca diversi tessuti vegetali e ha un'ampia gamma di ospiti, tra cui pomodoro (*Solanum lycopersicum*), patata (*Solanum tuberosum*), uva (*Vitis vinifera*) e fragola (*Fragaria spp.*), e causa importanti perdite economiche, sia nelle fasi pre che post raccolta (Mansfield, 1980).

Solitamente, lo sviluppo della muffa grigia è associato ad un aumento della produzione di etilene nei tessuti infetti, che molto spesso viene attribuito alla pianta ospite, ma è in realtà il fungo a sintetizzare l'etilene attraverso un meccanismo ancora non noto (Cristescu, 2002).

La sintomatologia associata alla presenza del fungo, si presenta su foglie, fusto e frutti. In particolare, sulle foglie è possibile verificare la presenza di macchie marroni che si espandono rapidamente, spesso circondate da una frangia gialla. Le foglie infette possono appassire e morire; sul fusto si presentano lesioni marroni che possono provocare la marcescenza e il collasso della pianta sotto il suo peso; sui frutti la presenza del fungo si evince dalla tipica “muffa grigia” (gergo comune con il quale viene chiamata *B.cinerea*, in inglese “grey mold”), con una consistenza soffice, che provoca il deterioramento del frutto.

Phytophthora infestans è un oomicete patogeno, agente eziologico della peronospora del pomodoro e della patata. Questo microrganismo è noto per causare devastanti perdite nelle colture agricole a livello globale, con significative implicazioni economiche e di sicurezza alimentare. Si ricordi ad esempio la “Grande carestia irlandese”, dovuta proprio alla peronospora della patata, che tra il 1845 e il 1848 distrusse gran parte delle coltivazioni del paese, portando alla morte di molti irlandesi e a fenomeni di emigrazione di massa.

P. infestans appartiene alla classe degli Oomiceti e al phylum degli Stramenopiles. Si distingue per le sue strutture riproduttive, inclusi i zoosporangi, che liberano zoospore biflagellate capaci di nuotare in acqua, e gli oospori, che sono le spore sessuate resistenti. Le ife del fungo sono cenocitiche (senza setti) e possono penetrare nei tessuti vegetali attraverso gli stomi o le ferite.

L'infezione da *P. infestans* nei pomodori si manifesta inizialmente con macchie idropiche, solitamente sui margini delle foglie, che evolvono in lesioni necrotiche di colore bruno. In condizioni di elevata umidità, si può osservare una muffa bianca, costituita dalle strutture sporulanti del fungo, sul lato inferiore delle foglie. Anche i fusti e i frutti possono essere colpiti con lesioni brunastre che possono estendersi rapidamente, mentre i frutti mostrano macchie irregolari e depresse, spesso con una crescita bianca fungina sulla superficie.

I danni causati da *Botrytis cinerea* e *P. infestans* sono significativi e possono portare al deperimento della pianta se non gestiti tempestivamente. La defogliazione dovuta all'infezione compromette la fotosintesi, riducendo il vigore della pianta e la resa del raccolto. Nei frutti, l'infezione non solo riduce la qualità commerciale, ma anche la possibilità di consumo e trasformazione industriale. Le perdite economiche sono notevoli, e comprendono i costi associati ai trattamenti fungicidi, alle riduzioni di resa e alla gestione del materiale infetto.

1.6 Trattamenti fungicidi su pomodoro contro *Botrytis cinerea* e *Phytophthora infestans*, conseguenti impatti ambientali e sulla salute dei consumatori in relazione ai principi del Green Deal europeo

I trattamenti fungicidi impiegati per la gestione e il contenimento di *B. cinerea* e *P. infestans* nel pomodoro sono essenziali per garantire la produttività e la qualità del raccolto. Tuttavia, l'uso intensivo di fungicidi comporta comprovati impatti ambientali e potenziali rischi per la salute dei consumatori, che sono sempre più attenti alla salubrità dei prodotti agroalimentari. I fungicidi possono persistere nell'ambiente, contaminando suoli e corsi idrici, e contribuire alla perdita di biodiversità e alla resistenza dei patogeni ai trattamenti chimici. Inoltre, residui

di fungicidi possono rimanere nei prodotti alimentari, sollevando preoccupazioni per la salute umana a causa della possibile esposizione a sostanze chimiche nocive (Chen *et al.*, 2021).

L'uso di fungicidi per il controllo di queste due fitopatie nel pomodoro include una serie di principi attivi specifici. Contro *B. cinerea*, i fungicidi più comuni sono boscalid (carbossimidi), fenexamid (idrossianilidi), fludioxonil (fenilpirroli) e cyprodinil (anilopirimidine), spesso utilizzati in combinazioni per migliorare l'efficacia e ridurre la resistenza del patogeno. Per *P. infestans*, vengono impiegati mancozeb (ditiocarbammati, ritirato in Europa nel 2021), metalaxyl-M (fenilammidi), cymoxanil (cianoacetammidi), propamocarb (carbammati), fluopicolide (benzamidi) e mandipropamide (mandelammidi). Questi trattamenti fungicidi, sebbene efficaci, comportano significativi impatti ambientali. A titolo esemplificativo, il mancozeb è noto per la sua elevata persistenza e la possibile tossicità per gli ecosistemi acquatici; oppure l'uso ripetuto di metalaxyl e propamocarb può portare allo sviluppo di resistenza nei patogeni, complicando la gestione delle malattie (Gisi *et al.*, 2017).

In questo contesto, il Green Deal europeo gioca un ruolo chiave nel promuovere pratiche agricole sostenibili: tra gli ambiziosi obiettivi postisi, mira a ridurre del 50% l'uso e il rischio dei pesticidi chimici entro il 2030, promuovendo la biodiversità e migliorando la qualità del suolo (European Commission, 2020). Questa iniziativa si allinea con la strategia "Farm to Fork", che punta a creare un sistema alimentare più sostenibile e sicuro riducendo l'uso di prodotti chimici e favorendo alternative che ci guidino attraverso la transizione ecologica.

Per raggiungere questi obiettivi, è necessario prima di tutto un approccio integrato che includa l'uso e lo sviluppo di varietà resistenti, insieme con pratiche quali la rotazione delle colture, l'impiego di agenti di controllo biologico e l'adozione di tecnologie avanzate per il monitoraggio delle malattie. Questi metodi non solo riducono l'impatto ambientale dei fungicidi, ma aumentano anche la resilienza dei sistemi agricoli e la sicurezza alimentare.

1.7 Approcci biotecnologici alternativi all'uso di fitofarmaci

Gli approcci biotecnologici rappresentano una promettente alternativa all'uso di fitofarmaci per la gestione delle malattie delle piante, incluso il pomodoro, in modo sostenibile ed ecocompatibile. Questi approcci includono le tecniche di mutagenesi, l'ingegneria genetica per la resistenza alle malattie, l'editing genomico come CRISPR/Cas9 e l'impiego di induttori di resistenza anche tramite tecniche di silenziamento genico basate sull'RNA interferente (RNAi).

- La mutagenesi chimica (uso di etilmetansulfonato (EMS) o nitroso-metilurea (NMU)) o fisica (radiazioni gamma) viene utilizzata per indurre mutazioni casuali nel genoma delle piante. Le piante mutanti vengono poi selezionate per tratti vantaggiosi, come la resistenza a specifici patogeni.
- L'ingegneria genetica introduce geni di resistenza omologhi (cisgenesi) o eterologhi (transgeni), comprendenti anche l'espressione di peptidi antimicrobici (AMPs) oppure di sequenze di RNAi con

azione di silenziamento di geni target specifici per la vitalità di patogeni o parassiti di interesse (Capriotti *et al.*, 2024). Questo processo può essere suddiviso in diverse fasi principali, che includono l'isolamento del gene di interesse, la costruzione del vettore genetico, la trasformazione delle cellule vegetali (mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, o diretta per via biolistica, gene gun, o per elettroporazione). Nel pomodoro, l'uso di RNAi ha dimostrato notevoli risultati per il miglioramento della resistenza a patogeni. Per esempio, l'RNAi è stato utilizzato per conferire resistenza a *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) silenziando i geni virali del TYLCV, mostrando una riduzione significativa dell'infezione virale (Anfoka, 2007). Una delle strategie più avanzate prevede l'uso di spray contenenti RNA a doppio filamento (dsRNA) veicolati da nanocarrier, per colpire specificamente i geni dei patogeni fungini come *Fusarium* e *Botrytis*, proteggendo così il pomodoro senza doverlo modificare geneticamente (Verma & Modgil, 2024) (Mat Jalaluddin *et al.*, 2023). Per quanto riguarda l'uso di AMPs in pomodoro, si è sfruttata la capacità di alcuni peptidi di penetrare nelle cellule dei patogeni e interferire con processi intracellulari vitali, come la sintesi proteica. Questo approccio è stato testato con successo su colture di pomodoro, dove è stato possibile ridurre l'incidenza di malattie causate da funghi patogeni come *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum* (Li *et al.*, 2023) (Zou *et al.*, 2023).

L'editing genomico, applicato con la tecnologia CRISPR/Cas9, permette modifiche precise e mirate nel genoma delle piante, incluso il pomodoro. L'adozione di tecniche di editing genomico ha ulteriormente affinato la precisione della modificazione genetica, consentendo interventi mirati e potenzialmente meno invasivi rispetto alle tecnologie precedenti (Jinek *et al.*, 2012). Il sistema CRISPR, che significa "Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats", è un meccanismo difensivo di origine batterica utilizzato per la modifica del DNA. Le cellule batteriche si difendono da virus estranei utilizzando piccoli frammenti di RNA chiamati RNA guida (gRNA), che si legano a una specifica sequenza di DNA bersaglio. Il gRNA, in combinazione con l'enzima Cas9, indirizza una rottura del doppio filamento del DNA nella posizione selezionata. La cellula può poi riparare questa rottura attraverso due principali meccanismi: la riparazione per ricongiungimento non omologo (NHEJ), che spesso porta a mutazioni, oppure la riparazione guidata da omologia (HDR), che permette l'inserimento di nuove sequenze genetiche. CRISPR/Cas9 è stato utilizzato nel pomodoro per introdurre mutazioni che conferiscono resistenza a vari patogeni, come funghi, virus e batteri. Ad esempio, la mutazione del gene *Mlo* ha permesso di ottenere resistenza all'oidio o "Powdery Mildew" (*Leveillula taurica* e *Oidium lycopersici*), importante agente patogeno fungino (Nekrasov *et al.*, 2017). Allo stesso modo, mutazioni indotte su geni implicati nella risposta ai virus hanno migliorato la resistenza a virus fitopatogeni, come il Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) (Tashkandi *et al.*, 2018). Recenti lavori dimostrano anche la potenzialità di CRISPR/Cas9 nel controllo di malattie batteriche come la maculatura batterica, mirata attraverso modifiche a specifici recettori (Cermak *et al.*, 2017). Questi approcci dimostrano l'elevata potenzialità della tecnologia CRISPR/Cas9 nel miglioramento delle varietà di pomodoro, soprattutto per la resistenza a patogeni di difficile controllo con metodi convenzionali (Pramanik *et al.*, 2021).

1.7.1 Innesto del pomodoro (resistenza/tolleranza a patogeni)

L'innesto è una pratica agronomica tradizionale e, in certi sensi, può essere considerata una sorta di biotecnologia dalle origini antiche (Cina antica, Greci e Romani, ecc.); l'innesto potrebbe essere considerato una biotecnologia perché coinvolge l'attuazione di modificazioni biologiche per migliorare le caratteristiche delle piante, un concetto centrale nella definizione di biotecnologia vegetale. Questa pratica, infatti comporta l'unione di due organismi vegetali distinti attraverso una saldatura di innesto. Durante questo processo, i tessuti della marza sono sovrapposti con precisione a quelli del portainnesto, appena tagliati, in base alla tecnica utilizzata, che varia a seconda del tipo di innesto, erbaceo o arboreo. Nella zona cambiale, le cellule superficiali della marza iniziano a formare cellule parenchimatiche, che si uniscono a quelle del portainnesto, creando un tessuto denominato callo, che contiene cellule indifferenziate che si trasformano nuovamente in cellule cambiali, capaci di generare nuovi vasi xilematici e floematici, ristabilendo dunque la connessione vascolare tra marza e portainnesto. Studi recenti hanno dimostrato che il successo dell'innesto dipende non solo dalla corretta esecuzione del processo, ma anche da fattori genetici e fisiologici, che influenzano la formazione del callo e la ricostituzione dei vasi (Pina & Errea, 2005; Melnyk, 2017). È importante sottolineare che l'innesto non implica una fusione cellulare, in quanto le cellule del portainnesto e della marza conservano la loro individualità, continuando a svolgere le loro funzioni specifiche mentre stabiliscono, invece, una connessione vascolare funzionale essenziale per il trasporto di nutrienti e molecole biochimiche verso organi distanti. Il sistema di tubi cribrosi, composto da cellule senza nucleo presenti nel floema delle angiosperme, è responsabile del trasporto di nutrienti (zuccheri e amminoacidi) ma anche di sostanze ormonali che regolano la crescita della pianta, come auxine, citochinine (Matsumoto-Kitano *et al.*, 2008) e gibberelline (Goldschmidt *et al.*, 2014), oltre che di fitormoni e molecole di segnalazione verso i diversi organi in sviluppo. Recentemente, si è scoperto che questi tubi cribrosi contengono inoltre una particolare popolazione di RNA e proteine. Le ricerche sugli innesti hanno dimostrato che molte di queste macromolecole possono viaggiare su lunghe distanze tra i tessuti, supportando l'esistenza di un sistema di comunicazione inter-organica mediato dal floema (Spiegelman *et al.*, 2015). Molecole di RNA come i piccoli RNA interferenti (siRNA) e i microRNA (miRNA) possono muoversi attraverso il floema, modulando l'espressione genica in risposta a stress ambientali o malattie (Kehr & Kragler, 2018). Attualmente, le nostre conoscenze sulle funzioni di queste macromolecole trasportate dal floema sono ancora molto limitate, ma si pensa siano responsabili di una certa espressione genica. Il traffico di informazioni genetiche sotto forma di piccoli RNA influisce sull'espressione dei geni sia attraverso il silenziamento di trascritti target che tramite la metilazione del DNA diretta dall'RNA (RdDM) (Tsaballa *et al.*, 2021) (Gebremichael *et al.*, 2021).

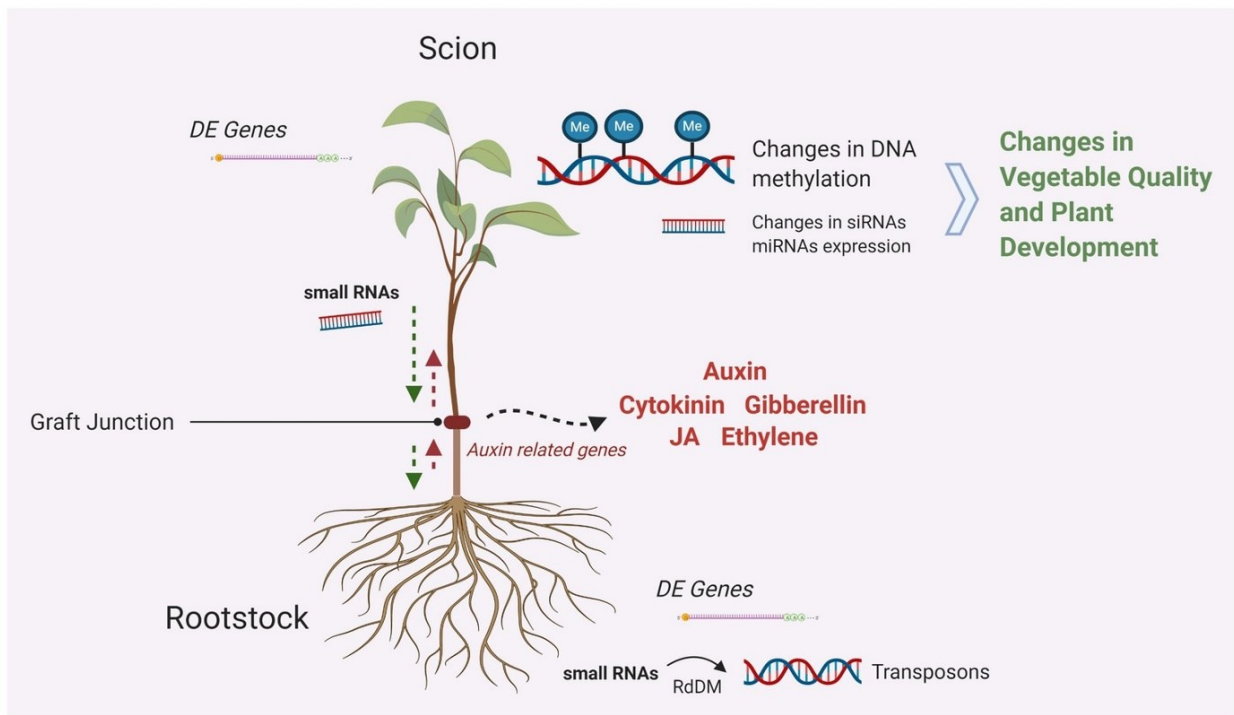


Figura 1: Riassunto grafico dei meccanismi molecolari che avvengono nelle piante innestate (Tsaballa et al., 2021)

L'innesto nel pomodoro è una tipologia di innesto erbaceo: le piantine devono essere giovani, in genere di 2-3 settimane, con 3-4 foglie vere. Il diametro del fusto delle piantine di marza e portinnesto dovrebbe essere il più simile possibile, generalmente compreso tra 1,5 e 2,5 mm. Un diametro corrisposto facilita l'allineamento dei tessuti cambiali, essenziale per una buona saldatura dell'innesto, e lo stadio fenologico garantisce che i tessuti siano ancora teneri e più facilmente unibili. Possono essere utilizzati diversi tipi di taglio: l'innesto a spacco o a incastro (Cleft grafting) in cui la giunzione viene assicurata tramite clip o fascia per assicurare contatto e stabilità, oppure l'innesto a tubo (Tube grafting), in cui un piccolo tubo di plastica trasparente viene utilizzato per tenere insieme i due segmenti.

Dopo l'innesto, le piantine devono essere mantenute in un ambiente ad alta umidità (85-90%) per favorire la formazione del callo e la guarigione del punto di innesto e devono essere protette dalla luce diretta del sole, utilizzando una luce diffusa e indiretta. La temperatura ottimale per la "guarigione" è tra 20-25°C, poiché temperature troppo elevate o troppo basse possono compromettere il successo dell'innesto. Dopo circa una settimana, le piante possono essere gradualmente acclimatate a condizioni ambientali normali, riducendo l'umidità e aumentando l'esposizione alla luce.

L'innesto erbaceo nel pomodoro è utilizzato principalmente per migliorare la resistenza a malattie del suolo (come *Fusarium oxysporum* e *Verticillium dahliae*) (Lee et al., 2010), per aumentare la produttività complessiva (Schwarz et al., 2010) e la tolleranza a stress abiotici (salinità, siccità e temperature estreme) (Rivero et al., 2003). I portainnesti resistenti vengono scelti per le loro capacità di conferire queste caratteristiche alle varietà di pomodoro innestate, che possono produrre frutti di alta qualità (Louws et al., 2010). La selezione di nuove

varietà viene effettuata, come per le marze, tramite tecniche in vivo convenzionali (incrocio), assistite anche da tecniche di selezione assistita (MAS), mutagenesi (chimica o fisica), come anche ingegneria genetica e CRISPR/Cas9.

1.7.2 Resistenza in pianta indotta attraverso le tecniche di ingegneria genetica: biotecnologie genetiche applicate al pomodoro

L'ingegneria genetica ha rivoluzionato il miglioramento delle colture, permettendo l'introduzione di geni di resistenza direttamente nelle piante. Questi geni esogeni possono essere di diversa natura: cisgenici (geni derivati dalla stessa specie o da specie strettamente correlate che possono essere naturalmente incrociati tra loro); intragenici (geni derivati dalla stessa specie o da specie strettamente correlate, ma che possono essere regolati da promotori e terminatori di geni diversi sempre scelti da un pool genetico sessualmente compatibile con l'ospite); transgenici (transgenesi, geni provenienti da specie diverse che non possono incrociarsi naturalmente, utilizzati per conferire nuove caratteristiche che non esistono nel pool genico della specie coltivata); geni sintetici (progettati e sintetizzati artificialmente in laboratorio, spesso combinando sequenze di DNA da diverse fonti per creare nuove caratteristiche).

L'induzione di resistenza è un processo mediante il quale una pianta viene modificata per sviluppare meccanismi di difesa contro patogeni e parassiti specifici, attraverso l'introduzione di geni di resistenza endogeni o esogeni che attivano risposte immunitarie, migliorando la capacità della pianta di riconoscere e contrastare l'infezione. La resistenza indotta che si viene a verificare, nel migliore dei casi, è una resistenza totale o immunità, dove la pianta non mostra alcun sintomo della malattia e il patogeno è incapace di stabilirsi o causare infezione. Tuttavia, nella maggior parte delle situazioni si osserva una resistenza parziale, cioè una riduzione dei sintomi della malattia nella pianta che il patogeno può ancora infettare, ma la severità della malattia è significativamente ridotta. Si parla invece spesso di tolleranza quando la pianta può essere infettata dal patogeno, ma la produttività e la qualità del raccolto non sono significativamente influenzate.

Le tecniche di ingegneria genetica per indurre resistenza nel pomodoro devono essere identificate a seconda degli obiettivi e della tipologia di piante. Per quanto riguarda le varietà di maggiore interesse risulta ottimale l'applicazione delle tecniche di Gene editing, in quanto permettono di indurre mutazioni specifiche per i geni di resistenza (R-genes) (Foster *et al.*, 2009), in varietà che poi possono essere propagate per seme. Per quanto riguarda i portinnesti, invece, si considera ancora di particolare interesse l'uso della trasformazione mediata dal batterio ingegnerizzato *Agrobacterium tumefaciens* caricato con costrutti plasmidici cisgenici o transgenici, che possono esprimere molecole **RNAi** (Capriotti *et al.*, 2024), proteine antimicrobiche (Jayaraj *et al.*, 2004) ed anche **peptidi antimicrobici (AMPs)** (Montesinos, 2007) (Rosa *et al.*, 2022). La trasformazione genetica tramite *A. tumefaciens* è una delle tecniche più comuni per introdurre geni di resistenza nel pomodoro. Questo batterio è in grado di trasferire un segmento di DNA (T-DNA) contenente il gene di interesse nel genoma della pianta ospite. Studi hanno mostrato che l'introduzione del gene *Pto* mediante *A. tumefaciens* conferisce resistenza

al batterio *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Questa resistenza è associata alla capacità della pianta di riconoscere e rispondere rapidamente all'infezione, limitando la crescita del patogeno (Martin *et al.*, 1993). L'introduzione di geni di resistenza nei portinnesti attraverso *A. tumefaciens* ha permesso invece di migliorare la tolleranza a patogeni terricoli come *Verticillium dahliae* e *Fusarium oxysporum*. Questi portinnesti resistenti riducono la necessità di trattamenti chimici e fisici (solarizzazione) al suolo e migliorano la salute generale della pianta (Oda, 2002).

La tecnologia RNAi è utilizzata per silenziare specifici geni patogeni o geni della pianta che i patogeni sfruttano per infettare, innescando un meccanismo di silenziamento genico post-trascrizionale tramite RNA a doppio filamento (dsRNA). Uno studio condotto da Fuentes *et al.* (2006) ha utilizzato la tecnologia RNAi per conferire resistenza al *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) in pomodoro, mostrando una buona riduzione della sintomatologia virale. Yin *et al.* (2009) hanno invece utilizzato l'RNAi per conferire resistenza al *Tomato Spotted Wilt Virus* (TSWV). Hanno sviluppato piante di pomodoro transgeniche esprimendo un costrutto RNAi mirato al gene nucleocapsidico del TSWV e le piante hanno mostrato una riduzione significativa dei sintomi del virus e una diminuzione complessiva del titolo virale.

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono piccoli peptidi naturali di diversa origine, che esercitano attività antimicrobica e immunostimolante. I peptidi sono importanti regolatori che partecipano alla modulazione di quasi tutti gli eventi fisiologici nelle piante, compresa la difesa. Ad esempio, introducendo il peptide catelicidina, presente nei mammiferi, nelle piante di pomodoro, si induce resistenza a patogeni batterici come *Xanthomonas* spp., responsabile della rognia batterica (particolarmente dannosa su pomodoro e peperone) (Jung, 2013).

1.7.2.1 Ingegneria genetica e OGM

Ingegneria genetica

L'ingegneria genetica ha avuto un impatto rivoluzionario sull'agricoltura moderna, principalmente attraverso la creazione di Organismi Geneticamente Modificati (OGM) che presentano caratteristiche migliorate, come la resistenza a malattie, l'efficienza nell'uso dei nutrienti e la tolleranza a condizioni ambientali avverse.

Il miglioramento genetico classico si basa su incrocio selettivo, dove il trasferimento di geni avviene tramite il rimescolamento del DNA di due piante parentali, in maniera piuttosto casuale. Non offre infatti un controllo preciso sui geni trasferiti; oltre ai tratti desiderati, possono essere ereditati anche geni indesiderati e richiede ulteriore selezione e cicli di backcrossing per stabilizzare e isolare le sequenze target. L'ingegneria genetica, al contrario, consente l'inserimento mirato di uno o pochi geni esogeni specifici direttamente nel genoma della pianta, utilizzando tecniche avanzate come i vettori plasmidici o la tecnologia CRISPR/Cas9, che permettono di integrare con precisione le sequenze desiderate. Questo approccio offre un elevato livello di controllo sui geni trasferiti, riducendo il rischio di introdurre sequenze off target. Il processo inizia con l'inserimento di DNA esterno nelle cellule vegetali, dove il materiale genetico si integra nel genoma nucleare attraverso ricombinazione

omologa o non omologa.; dopo l'integrazione, il gene viene espresso attraverso la produzione di RNA e proteine, che conferiscono alla pianta nuove caratteristiche fenotipiche (Gelvin, 2003). La regolazione dell'espressione genica è essenziale per garantire un'espressione corretta e stabile nel tempo, ed avviene attraverso la costruzione di cassette geniche con promotori, enhancers e altri elementi regolatori, inseriti nel costrutto insieme al gene d'interesse, che giocano un ruolo fondamentale in questo processo (Meyer, 1995). Inoltre, fattori epigenetici come la metilazione del DNA possono influenzare la stabilità e il silenziamento dell'espressione del gene inserito (Kohli et al., 2003).

Nel contesto della trasformazione genetica, una delle tecniche più consolidate è quella basata sul batterio *A. tumefaciens*, noto per la sua capacità di trasferire DNA alle piante attraverso il plasmide Ti (Zambryski et al., 1983). Questa metodologia, sviluppata per la prima volta negli anni '70, ha permesso l'inserimento stabile di geni specifici nelle piante, portando alla creazione di colture geneticamente modificate con miglioramenti significativi in termini di resistenza a parassiti e malattie. Inoltre, la tecnologia del DNA ricombinante ha rappresentato una svolta fondamentale, permettendo la manipolazione diretta del materiale genetico e l'espressione di geni esterni in piante (Cohen et al., 1973).

Agrobacterium tumefaciens è un batterio Gram-negativo noto per la sua capacità di trasferire segmenti specifici di DNA (T-DNA) dal suo plasmide Ti (tumor inducing) al genoma delle piante ospiti, inducendo la formazione di tumori chiamati galle del colletto. A livello molecolare, l'infezione inizia con il riconoscimento delle ferite della pianta, che rilasciano fenoli e zuccheri. Questi composti attivano i geni *vir* (virulence) presenti sul plasmide Ti, che sono essenziali per il trasferimento del T-DNA. Il sistema di secrezione di tipo IV, codificato dai geni *vir*, facilita il trasferimento del T-DNA e di alcune proteine accessorie dalla cellula batterica alla cellula vegetale. All'interno della cellula vegetale, il T-DNA è guidato verso il nucleo grazie alle proteine VirD2 e VirE2, che proteggono il T-DNA dalla degradazione e aiutano la sua integrazione nel genoma nucleare della pianta (Gelvin, 2003). La virulenza dell'*Agrobacterium* è influenzata sia dalle caratteristiche del ceppo batterico sia dalle condizioni ambientali durante la co-coltura con il tessuto vegetale destinato alla trasformazione. L'attività dei geni *vir* può essere modulata da vari fattori, inclusi il pH, la temperatura e le condizioni del mezzo di co-coltura (Sansavini et al., 2014). Una volta integrato, il T-DNA contiene geni che codificano per la sintesi di opine, composti utilizzati dall'*A. tumefaciens* come fonte di carbonio e azoto, e geni che promuovono la proliferazione cellulare, causando la formazione delle galle (Zupan & Zambryski, 1995). Questo meccanismo è stato ampiamente studiato e sfruttato in biotecnologia vegetale per l'ingegneria genetica delle piante.

OGM

La creazione di OGM ha suscitato un ampio dibattito su questioni normative e di sicurezza. Le tecnologie considerate OGM includono il trasferimento genico tramite *A. tumefaciens*, la transgenesi e cisgenesi, il gene editing con CRISPR-Cas9, la fusione di protoplasti, l'RNA interference (RNAi) e la ricombinazione mediata sito-specifica. Le normative variano significativamente a livello globale. L'Unione Europea adotta un approccio rigoroso, richiedendo una dettagliata valutazione del rischio e l'etichettatura obbligatoria per i prodotti contenenti OGM, riflettendo un maggior utilizzo del principio di precauzione nell'approccio alle biotecnologie vegetali

(European Commission, 2020). In particolare, il contesto europeo si avvale di una regolamentazione degli OGM tra le più restrittive al mondo; la legislazione Europea chiave include: la Direttiva 2001/18/CE (regola l'emissione nell'ambiente, l'uso e la commercializzazione di OGM e dei loro derivati), il Regolamento (CE) n. 1829/2003 (disciplina l'autorizzazione e l'etichettatura degli OGM destinati all'alimentazione umana e animale) e il Regolamento (CE) n. 1831/2003 (stabilisce le norme per la tracciabilità e l'etichettatura degli OGM e dei prodotti derivati, facilitando la loro identificazione lungo tutta la catena alimentare). Nonostante le rigorose normative, gli OGM sono utilizzati in Europa in contesti specifici e ben regolamentati. Un solo OGM, il mais Bt MON810 resistente a certi fitofagi è autorizzato per la coltivazione in Europa, sebbene le aree dedicate a tali colture siano limitate (European Commission; 2020 https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms_en). Gli OGM sono inoltre utilizzati prevalentemente come ingredienti in alimenti e mangimi animali, dove la loro presenza deve essere chiaramente etichettata. Oltre a questi due destinazioni d'uso, sono studiati in ricerca scientifica e biotecnologica per sviluppare nuove varietà di piante. A differenza che per la coltivazione, in Europa, grazie all'applicazione della direttiva 1829/2003, è autorizzata l'importazione ed uso di prodotti da più di 100 piante OGM coltivate in altri paesi.

L'interpretazione e l'opinione sulle normative europee può avere natura ambivalente, in quanto da un lato queste sono frutto della resistenza sociale e politica influenzata da preoccupazioni per la sicurezza alimentare, l'ambiente e la biodiversità, e dall'altro sono spesso percepite da esperti del settore come eccessivamente restrittive e che rallentano l'innovazione tecnologica. Questo contrasto con le politiche più efficaci per lo sviluppo agricolo di altri paesi come ad esempio Argentina, Brasile, Stati Uniti e Canada, hanno compromesso la competitività e autosufficienza alimentare dei paesi europei (Tramper *et al.*, 2011).

I benefici derivanti dall'applicazione delle tecniche di ingegneria genetica nelle piante coltivate in Europa ed in Italia in particolare sono molteplici, includendo non solo miglioramenti in termini di produttività e sostenibilità agricola, ma anche sfide etiche e ambientali. Le discussioni continuano su come bilanciare i benefici della biotecnologia con le preoccupazioni riguardanti la sicurezza alimentare e l'impatto ambientale. Le normative esistenti sono solide e più che efficienti per garantire la sicurezza alimentare ed ambientale nella coltivazione di qualsiasi nuova pianta biotecnologica utile per risolvere le problematiche della nostra agricoltura, manca solo la consapevolezza politica dell'affrontare questa problematica secondo appropriati approcci scientifici, abbandonando qualsiasi preconcetto ideologico. Il perseverare con questo approccio renderà la politica sempre più responsabile del danno fatto per la sopravvivenza del settore agricolo Europeo ed Italiano.

1.7.2.2 Geni marcatori e geni reporter

I geni marcatori e i geni reporter sono componenti fondamentali nei costrutti genici e nelle tecnologie di ingegneria genetica e biotecnologia, giocando ruoli cruciali nella selezione e nell'analisi delle trasformazioni genetiche.

Tra i più utilizzati geni marcatori di selezione, vi sono quelli in grado di conferire resistenza a composti come antibiotici o erbicidi, consentendo la selezione delle cellule trasformate che hanno integrato il gene di interesse nel loro genoma. Esempi comuni di geni marcatori includono la *neomicina fosfotransferasi II (nptII)*, che conferisce resistenza alla kanamicina, e il gene *bar*, che conferisce resistenza al glifosato. Questi marcatori sono utilizzati per identificare e isolare efficacemente gli eventi cellulari che hanno subito l'evento di modificazione genetica attesa, eliminando le cellule non trasformate che non possiedono la resistenza conferita dai geni marcatori, e promuovendo la rigenerazione di nuove piante modificate in modo stabile ed omogeneo e non chimerico.

I geni reporter, spesso utilizzati insieme ai geni marcatori, codificano proteine che emettono segnali rilevabili come la fluorescenza o l'attività enzimatica, semplificando l'analisi e la misurazione dell'espressione genica in vivo. Un esempio ben noto è il gene *gfp* (*green fluorescent protein*), che permette di monitorare la localizzazione e l'intensità dell'espressione genica in diversi organismi. Questa proteina fluorescente è osservabile tramite microscopia a fluorescenza, facilitando lo studio della localizzazione subcellulare delle proteine e della dinamica dell'espressione genica. Un altro importante gene reporter è il gene *gus* (*β-glucuronidasi*), ampiamente impiegato nelle piante per studiare l'espressione genica e la regolazione dei promotori, che codifica per un enzima che catalizza una reazione colorimetrica facilmente misurabile, rendendo possibile una quantificazione accurata dell'attività genica in diverse condizioni sperimentali. Tuttavia, il saggio enzimatico basato su *gus* porta alla distruzione del tessuto vegetale, limitandone l'uso rispetto alla *gfp*.

L'impiego combinato di geni marcatori e reporter non solo facilita la selezione delle cellule trasformate, ma consente anche un'analisi approfondita dell'espressione e della regolazione dei geni ingegnerizzati. Questi strumenti sono essenziali per comprendere meglio i processi biologici e migliorare le strategie di modificazione genetica in piante e animali, contribuendo allo sviluppo di applicazioni biotecnologiche più sicure ed efficienti (Prasher *et al.*, 1992).

1.7.2.3. RNA interference (RNAi) e cross kingdom RNAi

L'RNA interference (RNAi) rappresenta una scoperta rivoluzionaria nel campo della biologia molecolare e della genetica, ed ha aperto nuove frontiere nella ricerca biologica e biomedica, con applicazioni che vanno dal controllo dei parassiti agricoli al trattamento di malattie genetiche e infettive negli esseri umani. Questa tecnica si basa su un processo regolatorio naturale presente nelle cellule eucariotiche, scoperto inizialmente nelle piante e nei nematodi, ma successivamente osservato in un'ampia varietà di organismi. Esso è fondamentale per il controllo dell'espressione genica, la difesa antivirale e la stabilità genomica (Fire *et al.*, 1998). L'RNAi viene attivato dall'introduzione di RNA a doppio filamento (dsRNA) che può derivare da diverse fonti, tra cui intermedi virali, RNA endogeno o RNA esogeno sintetico introdotto dall'esterno (Mohr *et al.*, 2010). La molecola di dsRNA viene riconosciuta e processata dall'enzima Dicer, che la taglia in piccoli RNA interferenti (siRNA) di circa 19-24 nucleotidi. Questi siRNA vengono poi incorporati in un complesso proteico chiamato

RNA-induced silencing complex (RISC). Durante l'assemblaggio del RISC, un filamento del siRNA (il filamento guida) viene conservato, mentre l'altro (il filamento passeggero) viene degradato (Carthew & Sontheimer, 2009). Il filamento guida del siRNA all'interno del RISC dirige il complesso verso un mRNA bersaglio con sequenze complementari. Questo porta alla degradazione dell'mRNA bersaglio o all'inibizione della sua traduzione. Nel primo caso, il RISC taglia l'mRNA bersaglio, che viene poi degradato da nucleasi cellulari, riducendo così i livelli di mRNA disponibile per la traduzione. Nel secondo caso, il legame del RISC all'mRNA impedisce l'assemblaggio del complesso di traduzione ribosomiale, bloccando la sintesi proteica (Wilson & Doudna, 2013).

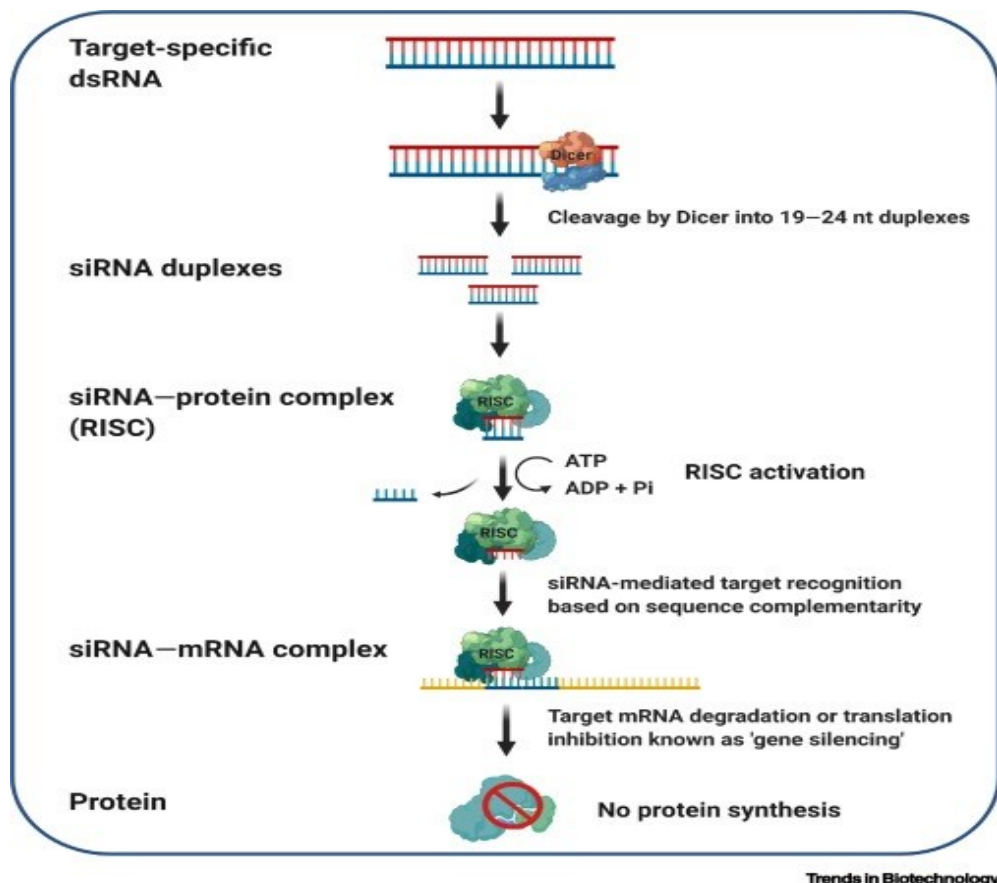


Figura 2: Illustrazione del meccanismo di silenziamento genico mediato da RNAi (RNAi-Mediated Gene Silencing) (Taning et al., 2021)

Negli ultimi anni, una delle evoluzioni più affascinanti dell'RNAi è stata l'emergere del concetto di cross-kingdom RNAi (ckRNAi), processo mediante il quale molecole di RNAi possono essere trasferite tra organismi appartenenti a regni differenti, influenzando la regolazione genica attraverso le barriere tassonomiche. Questa scoperta ha profonde implicazioni sia per la biotecnologia agricola e sia per la medicina.

Questo fenomeno ha trovato particolare applicazione nel campo delle biotecnologie vegetali, dove offre soluzioni innovative per la protezione delle colture e il miglioramento della resistenza alle malattie. Uno degli esempi più significativi dell'applicazione del concetto di ckRNAi in agricoltura è il controllo degli insetti

erbivori.

Le metodologie HIGS (Host-Induced Gene Silencing) sono tecniche avanzate di biotecnologia vegetale che mirano ad avere la produzione stabile in pianta di siRNA capaci disilenziare geni vitali per parassiti o patogeni target della pianta ospite. Questo avviene attraverso l'introduzione di sequenze che esprimono nella pianta ospite dsRNA, identificati per i geni target del patogeno, che vengono poi processate in piccoli RNA interferenti (siRNA). Questi siRNA vengono trasferiti dal vegetale al patogeno durante l'interazione ospite-patogeno, dove innescano il meccanismo di RNA interference (RNAi), silenziando geni cruciali per la sopravvivenza o la virulenza del patogeno.

Piante con l'espressione stabile di RNAi specifici contro geni essenziali di fitofagi come *Diabrotica virgifera virgifera* (coleottero del mais), *Leptinotarsa decemlineata* (dorifora della patata) e *Helicoverpa armigera*, sono risultate resistenti ai rispettivi patogeni. Gli insetti che si nutrono di queste piante ingeriscono i dsRNA, che interferiscono con l'espressione genica e provocano la morte o un grave danno all'organismo infestante. Questo approccio rappresenta una soluzione ecologicamente sostenibile rispetto agli insetticidi chimici tradizionali, riducendo l'impatto ambientale e migliorando la sicurezza alimentare (Baum *et al.*, 2007).

Un altro degli utilizzi più promettenti del RNAi e della tecnica HIGS è nella protezione delle colture contro i patogeni fungini. Un esempio riguarda l'induzione di resistenza contro il patogeno fungino *Blumeria graminis*, l'agente eziologico della ruggine bianca nei cereali. Questi geni includono quelli coinvolti nella sintesi della parete cellulare e nella risposta alla difesa della pianta. Quando il fungo infetta le piante trattate, le molecole di dsRNA interferiscono con l'espressione dei geni del fungo, riducendo significativamente la sua capacità di causare malattia (Nowara *et al.*, 2010).

In un altro caso studio è stata dimostrata l'efficacia dell'interferenza dell'RNA (RNAi) nel ridurre l'incidenza della muffa grigia nelle fragole. Utilizzando questa tecnica sia con trattamento topico con dsRNA (SIGS), sia con l'espressione in planta (HIGS) di costrutti genetici mirati ai geni *BcDCL1* e *BcDCL2* di *Botrytis cinerea*, è stata significativamente ridotta la suscettibilità delle fragole a questo patogeno (Capriotti *et al.*, 2024).

L'approccio SIGS (Spray-Induced Gene Silencing) è una tecnica innovativa di silenziamento genico basata sull'applicazione di RNAi spray sulle piante, offrendo opportunità per il controllo mirato dei patogeni senza modificare il genoma delle colture, riducendo così l'uso di pesticidi chimici.

Le strategie RNAi si esplicano quindi con due tecniche avanzate di silenziamento genico per la protezione delle piante, come descritto in Figura 3: HIGS (Host-Induced Gene Silencing) e SIGS (Spray-Induced Gene Silencing). HIGS implica la modificazione genetica delle piante ospiti per esprimere molecole di RNA interferente (RNAi) che silenziano specifici geni dei patogeni, conferendo così una resistenza duratura. SIGS, invece, consiste nell'applicazione esogena di dsRNA o siRNA direttamente sulle superfici delle piante, inducendo il silenziamento genico nei patogeni senza alterare il genoma della pianta ospite. Entrambe le tecniche rappresentano approcci promettenti per il controllo sostenibile delle malattie vegetali, con HIGS che offre una resistenza più prolungata e SIGS che permette interventi non transgenici, ampliando le applicazioni pratiche nel miglioramento delle colture (Taning *et al.*, 2020).

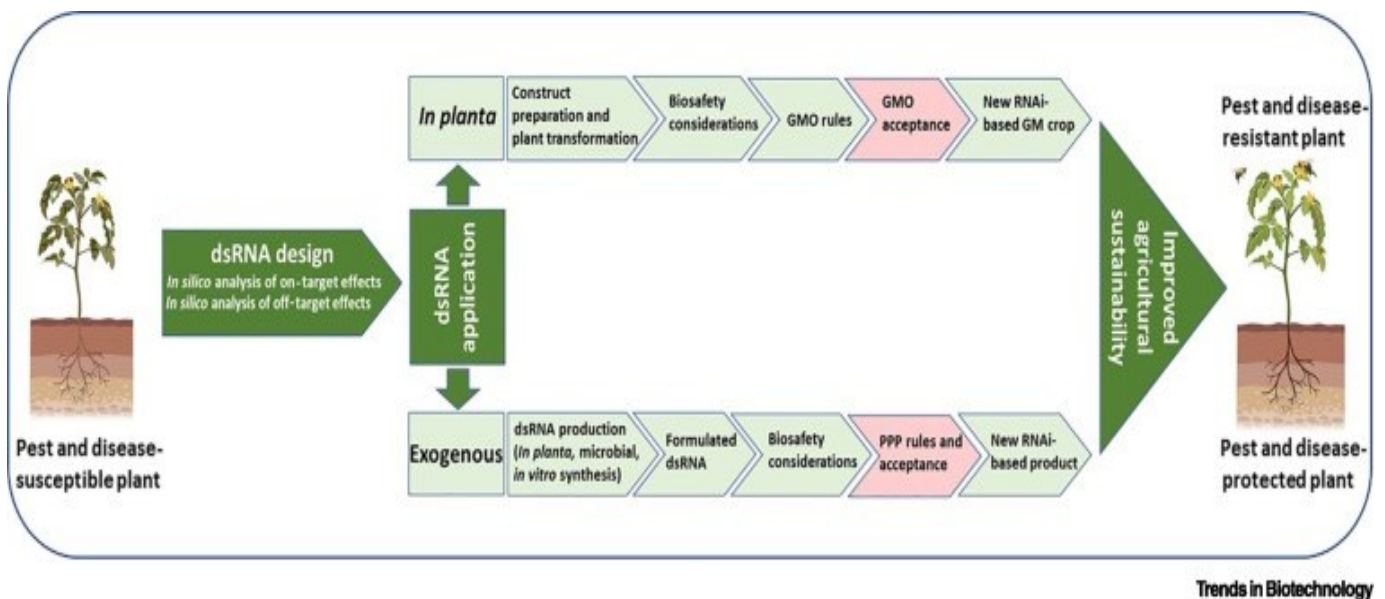


Figura 3: I due principali approcci biotecnologici basati sulla tecnologia RNAi per il controllo delle fitopatie nelle piante (Taning et al., 2020)

1.7.2.4 Combinazione tecniche di ingegneria genetica ed innesto per induzione di resistenza su marza (Transgrafting)

L'uso di portinnesti geneticamente modificati ha il potenziale per estendere l'utilità orticola dell'innesto combinando questa antica tecnica con le strategie molecolari dell'era moderna (Haroldsen *et al.*, 2012).

L'innesto di marze non transgeniche su portainnesti GM (trans-innesto) migliora le caratteristiche agronomiche senza introdurre geni estranei nelle marze, anche se i frutti potrebbero essere influenzati dai geni GM del portainnesto. L'effetto dell'innesto di marze su portainnesti GM dovrebbe essere analizzato anche da un punto di vista di sicurezza d'uso. Uno studio di Kodama *et al.* (2021) ha valutato l'impatto del gene β -glucuronidasi (GUS) su frutti di pomodoro innestati, mostrando che non ci sono state differenze significative nello sviluppo, nel peso fresco, o nelle analisi omiche dei frutti tra portainnesti GM e non GM. I risultati indicano che l'innesto su portainnesti GM non altera le caratteristiche genetiche o metaboliche delle marze.

Un altro studio di Zhao e Song (2014) esplora il trasferimento di molecole RNAi derivanti da transgeni dal portainnesto alla marza nel ciliegio dolce non transgenico. Dimostra che le molecole RNAi possono conferire resistenza virale alla marza senza modificare il genoma della pianta fruttifera. Questo approccio potenzia la sicurezza e l'efficacia della resistenza alle malattie senza l'introduzione diretta di geni estranei nelle piante coltivate. In particolare, questo studio ha confermato, per la prima volta, il trasferimento a lunga distanza (1,2 m) di siRNA derivati da PNRSV-hpRNA dal portainnesto transgenico alla marza non transgenica nelle piante legnose. L'inoculazione di marze non transgeniche con *PNRSV* (*Prunus necrotic ringspot virus*) ha rivelato che i siRNA trasferiti hanno aumentato la resistenza al *PNRSV* delle marze innestate sui portainnesti transgenici. I portainnesti transgenici che esprimono costrutti per creare resistenza a specifici virus non producono nuove

proteine, poiché il transgene è solo trascritto, generando sRNA omologhi al trascritto virale da silenziare, senza traduzione in proteine. Di conseguenza, non si formano nuove proteine ed enzimi che richiedano valutazioni di sicurezza (Lemgo *et al.*, 2013).

Altro esempio importante è quanto stato rilevato in susino dove piante con espressione stabile di dsRNA target per il Plum Pox Virus, il virus della Sharka delle drupacee, quando usate come portinnesto, hanno conferito resistenza al nesto, addirittura eliminando il virus (Albuquerque *et al.*, 2023).

L'assenza di traslocazione del transgene o del suo mRNA dal portinnesto alla marza (Smolka *et al.*, 2010) costituisce il criterio chiave nel contesto normativo attuale per cui, nella pratica dell'innesto di una pianta con portinnesto GM e marza non modificata, i frutti prodotti dalla pianta risultante sono considerati come frutti "geneticamente non modificati", e sono considerate OGM solo le radici derivate portinnesto il cui DNA ha subito l'evento di ricombinazione genetica. Il materiale vegetale sopra il punto di innesto (la marza) non possiede infatti il DNA del portinnesto. Pertanto, i frutti che si sviluppano dalla marza non contengono direttamente il materiale genetico del portinnesto GM.

Questo aspetto è fondamentale anche da un punto di vista di percezione di sicurezza alimentare da parte del consumatore e il trans-innesto potrebbe dunque risultare come una possibile soluzione per l'affermazione delle biotecnologie vegetali più avanzate in paesi "conservatori" come l'UE.

Il trans-innesto offre anche vantaggi per l'ambiente, poiché con una corretta gestione colturale (ad esempio l'eliminazione precoce dei polloni) i problemi relativi al flusso di polline sarebbero ridotti al minimo, grazie al fatto che la marza non ingegnerizzata sarebbe l'unica fonte di polline (Lev-Yadun & Sederoff, 2001; COGEM, 2006).

La deregolamentazione di uno o di un numero limitato di portainnesti, inoltre, utilizzabili con una o più varietà di cultivar o marze, rappresenta un'opzione preferibile rispetto all'ingegnerizzazione genetica di ogni singola varietà usata come marza. Questo approccio è particolarmente vantaggioso, considerando che negli USA i costi associati alla deregolamentazione di ciascuna linea geneticamente modificata oscillano tra i 6 e i 15 milioni di dollari (Kalaitzandonakes *et al.*, 2007). Un portainnesto deregolamentato potrebbe essere impiegato con diverse cultivar di marza e, in alcuni casi, persino tra generi diversi. Ottenere tali vantaggi mantenendo la marza priva di DNA transgenico potrebbe agevolare l'introduzione commerciale delle colture speciali OGM, riducendo la necessità di deregolamentare ogni cultivar individualmente e, di conseguenza, alleviando l'onere finanziario per i produttori (Haroldsen *et al.*, 2012).

1.7.3 Espressione stabile di peptidi antimicrobici e costrutti RNAi

L'espressione stabile di peptidi antimicrobici (AMPs) e costrutti RNAi nelle piante rappresenta una strategia promettente per migliorare la resistenza alle malattie. Per ottenere un'espressione stabile, è cruciale l'integrazione efficiente del transgene nel genoma della pianta, seguita da una regolazione appropriata e sostenuta

dell'espressione genica. Questo processo inizia con la scelta del promotore, che deve essere forte (costitutivo) e/o possibilmente specifico per il tessuto o per l'organismo bersaglio, al fine di garantire un'espressione ottimale del transgene senza effetti collaterali indesiderati sulla pianta ospite. La selezione del promotore è seguita dalla costruzione di cassette di espressione ottimizzate, che includono anche sequenze leader non tradotte (UTR) per migliorare la stabilità e la traduzione dell'mRNA. Dopo l'introduzione del transgene in pianta (via Agrobatterio-mediata o via biolistica-diretta) e a seguito della trasformazione, la selezione di eventi di integrazione stabili è un passaggio critico. Ciò implica l'identificazione di linee transgeniche in cui il transgene è stato inserito in siti genomici che favoriscono un'espressione robusta e continua nel tempo, evitando effetti di silenziamento genico post-trascrizionale o epigenetico che potrebbero comprometterne l'efficacia (Matzke & Matzke, 1998). Una volta ottenuta l'integrazione stabile, l'espressione del transgene deve essere confermata e monitorata attraverso diverse generazioni di piante, utilizzando tecniche molecolari come la PCR, il Northern blot, l'analisi proteomica e il saggio di attività biologica del peptide o del costrutto RNAi espresso.

Per quanto riguarda i AMPs, l'obiettivo principale è ottenere un'espressione costitutiva o inducibile del peptide nelle piante, al fine di garantire non solo l'integrazione stabile nel genoma della pianta, ma anche la produzione efficace e localizzata del peptide in risposta all'infezione patogena. Uno degli aspetti fondamentali per l'espressione stabile degli AMPs è la scelta del promotore. Il promotore *CaMV 35S* del virus del mosaico del cavolfiore è comunemente utilizzato per garantire un'espressione costitutiva del transgene in varie parti della pianta, ma può non essere ideale per tutte le applicazioni, specialmente se l'espressione del peptide in tessuti specifici è necessaria per evitare effetti fitotossici o per risparmiare risorse energetiche della pianta (van Loon *et al.*, 2006). In alternativa, promotori inducibili o specifici per organo possono essere utilizzati per dirigere l'espressione del peptide antimicrobico in risposta a segnali patogeni o in tessuti particolarmente vulnerabili all'attacco.

Inoltre, la stabilità e l'efficacia degli AMPs possono essere migliorate mediante la loro localizzazione subcellulare specifica. I peptidi possono essere diretti verso compartimenti cellulari specifici, come il vacuolo o la parete cellulare, dove possono accumularsi e interagire più efficacemente con i patogeni invasori. La fusione dei geni degli AMPs con sequenze di segnale per la secrezione è una strategia comune per assicurare che i peptidi siano esportati fuori dalla cellula, dove possono interagire direttamente con i patogeni (Jha *et al.*, 2009). Ad esempio, il peptide defensina ha mostrato un'efficacia notevolmente aumentata contro i funghi fitopatogeni quando era diretto verso la parete cellulare tramite una sequenza di segnale specifica, piuttosto che rimanere all'interno della cellula (Stotz *et al.*, 2009).

L'espressione stabile dei costrutti RNAi nelle piante richiede un approccio differente rispetto agli AMPs, poiché il meccanismo di RNA interference (RNAi) dipende dalla produzione di RNA a doppio filamento (dsRNA) che attivano la degradazione specifica degli mRNA bersaglio. Un aspetto cruciale nella progettazione dei costrutti RNAi è la selezione di sequenze dsRNA che siano complementari a regioni essenziali e conservate dei geni del patogeno, per garantire un silenziamento efficace e specifico, riducendo al minimo il rischio di effetti su geni off-target (Fire *et al.*, 1998) ed anche una ridotta probabilità di superamento della resistenza mediante una mutazione del gene target del patogeno. La scelta del promotore per dirigere l'espressione del dsRNA è

strategica: promotori forti e costitutivi, come il *CaMV 35S*, possono essere impiegati per un'espressione ubiquitaria, mentre promotori tessuto-specifici, come quelli attivi nelle cellule compagne del floema, sono preferibili quando è necessario trasportare i siRNA derivati dal dsRNA a lunghe distanze all'interno della pianta (Wang *et al.*, 2018).

A differenza dell'espressione di AMPs, che punta a produrre direttamente composti antimicrobici attivi, l'approccio RNAi modula l'espressione genica del patogeno stesso, interferendo con la sua capacità di proliferare e causare danni alla pianta. Entrambi i metodi richiedono un'attenta ottimizzazione delle condizioni di espressione e una solida integrazione nel genoma della pianta per assicurare che la protezione offerta sia efficace e duratura, consentendo alle colture di resistere alle malattie in maniera specifica e sostenibile nel tempo.

1.7.4 Applicazione esogena di peptidi antimicrobici e dsRNA (SIGS)

L'applicazione esogena di dsRNA (SIGS) e di peptidi antimicrobici rappresenta due avanzati approcci biotecnologici per il controllo delle malattie vegetali, ciascuno basato su meccanismi molecolari distinti ma complementari. Entrambe le tecniche offrono potenziali vantaggi significativi in termini di sostenibilità ambientale e sicurezza.

L'applicazione esogena di dsRNA (SIGS) comporta la somministrazione di RNA a doppio filamento (dsRNA) sulle superfici vegetali, dove può essere assorbito dalle cellule delle piante. In seguito all'assorbimento, il dsRNA viene trasferito ai patogeni durante l'interazione tra patogeno e ospite, e viene quindi elaborato dal sistema di interferenza a RNA (RNAi) per generare piccoli RNA interferenti (siRNA). Questi siRNA mirano a silenziare specifici geni nei patogeni, riducendo così la loro virulenza o sopravvivenza. Questo metodo offre un'efficace protezione contro patogeni fungini e virali, senza modificare il genoma della pianta ospite. A differenza dei pesticidi chimici, il dsRNA è ecocompatibile, in quanto si degrada rapidamente e non lascia residui pericolosi nell'ambiente (Taning *et al.*, 2020). Diverse ricerche hanno dimostrato che l'uso di dsRNA riduce in maniera significativa le infezioni da *Botrytis cinerea* in vari contesti agricoli, sia in pre che in post raccolta (Islam & Sherif, 2020; Capriotti *et al.*, 2024; Vatanparast *et al.*, 2024).

Recentemente, i peptidi antimicrobici naturali (AMPs) – molecole biologicamente attive di lunghezza inferiore ai 100 amminoacidi – sono emersi come promettenti agenti di protezione delle colture. Questi peptidi, prodotti da una vasta gamma di organismi come parte fondamentale della loro risposta immunitaria innata, sono stati catalogati nel database Antimicrobial Peptide Database, dove sono classificati in base alla loro origine biologica, attività, composizione aminoacidica e caratteristiche strutturali. Gli AMPs (peptidi antimicrobici) sono molecole prodotte da diverse fonti biologiche, come mammiferi, anfibi, insetti, microrganismi e piante, e svolgono un ruolo fondamentale nella difesa contro una vasta gamma di patogeni. Questi peptidi possono contenere amminoacidi apolari come prolina, triptofano e glicina, oppure amminoacidi basici come istidina e arginina, con alcuni che combinano entrambe le tipologie, come quelli ricchi di triptofano e arginina. Le loro strutture possono

variare tra α -eliche, fogli β e conformazioni lineari. Alcuni AMPs derivano da proteine precursori che, attraverso specifiche modificazioni, si trasformano in molecole attive con proprietà antimicrobiche (Rosa *et al.*, 2022).

I vantaggi principali dell'utilizzo di AMPs includono un ridotto rischio di resistenza da parte dei patogeni e la possibilità di usarli in sinergia con altre soluzioni di difesa delle piante. A differenza delle modifiche genetiche permanenti che si osservano con tecniche come il Gene Silencing Mediato da Ospite (HIGS), l'applicazione esogena di AMPs e dsRNA permette una protezione temporanea ed evita la manipolazione genetica stabile dell'ospite. Tali trattamenti possono essere somministrati direttamente alle piante attraverso spray fogliari o trattamenti al suolo, fornendo una protezione immediata e specifica contro vari patogeni, senza alterare permanentemente il genoma della pianta.

I formulati peptidici possono essere progettati per mirare specificamente a patogeni fungini o batterici, grazie alla loro struttura adattabile e alla possibilità di sintetizzare peptidi derivati da specie diverse. Questo permette di ottimizzare la loro efficacia contro patogeni emergenti, riducendo il rischio di resistenza e contribuendo alla sostenibilità delle pratiche agricole (Rosa *et al.*, 2022). Allo stesso modo, i formulati a base di dsRNA, essendo altamente specifici per i target genomici dei patogeni, offrono un'alternativa sicura ed ecocompatibile ai pesticidi chimici tradizionali, in linea con gli obiettivi di sostenibilità del Green Deal (Taning *et al.*, 2020).

L'applicazione esogena di dsRNA e AMPs rappresenta difatti un'alternativa promettente ai fungicidi convenzionali, con vantaggi in termini di sostenibilità, riduzione della resistenza dei patogeni e impatto ambientale limitato. L'integrazione di questi approcci nelle strategie di difesa delle colture può rappresentare una svolta nella gestione delle malattie, riducendo la dipendenza da prodotti chimici di sintesi.

Capitolo 2

SCOPI

Il presente lavoro di tesi si propone di investigare e ottimizzare protocolli avanzati di rigenerazione e selezione di linee del portinnesto di pomodoro 'Beaufort' esprimenti sequenze di dsRNA e peptidi capaci di controllare i principali patogeni del pomodoro. L'oggetto principale di studio è l'implementazione di questi protocolli usando costrutti genetici esprimenti peptidi antimicrobici (CP20) e molecole di RNAi (Bc DCL1/2), al fine di indurre resistenza a due patogeni di rilevante importanza economica e agronomica, *Phytophthora infestans* e *Botrytis cinerea*, rispettivamente. L'intervento di espressione stabile in pianta di queste piccole molecole è stato specificamente indirizzato sul portinnesto anziché sulla marza, con l'intento, in un prossimo futuro, di verificare il trasferimento del fenomeno di resistenza dal portinnesto alla marza attraverso la tecnica dell'innesto, creando così una strategia integrata che potrebbe amplificare l'efficacia della resistenza e garantire una protezione più completa per la pianta, sfruttando inoltre le recenti scoperte sul “ponte” di informazioni genetiche tra portinnesto e marza sotto forma di piccoli RNA, influenti sull'espressione genica. L'espressione stabile nelle cellule vive del portinnesto di dsRNA può portare alla mobilità di queste piccole molecole dal portinnesto al nesto attraverso il sistema vascolare conferendo resistenza anche alle varietà innestate, non geneticamente modificate. (Limera *et al.*, 2017).

La tesi vuole porre attenzione sull'utilizzo di questa biotecnologia per indurre resistenza a patogeni in pomodoro mediante l'espressione stabile in portinnesti di piccole molecole, come dsRNA e peptidi antimicrobici (AMPs), così da valutare la mobilità delle molecole espresse dall'apparato radicale del portinnesto alla chioma e ai frutti e la capacità di conferire resistenza ai patogeni target nell'intera pianta, pur avendo modificato geneticamente solo le radici. Questa nuova tecnologia potrebbe rappresentare globalmente un'alternativa valida all'uso di pesticidi per il contenimento delle fitopatie. La situazione attuale vede come limitazione maggiore all'uso dei prodotti risultanti da queste tecniche l'accettabilità di questi nuovi prodotti da parte dell'opinione pubblica, che varia notevolmente tra Europa, USA, Asia e Oceania. Tuttavia, l'approccio di resistenze trasmesse dal portinnesto – OGM a frutti non – OGM, sicuramente risulta di più facile gestione in termini di valutazione di rischio ambientale e possibilmente anche di accettabilità dell'opinione pubblica.

In aggiunta, la tesi esplora la possibilità di micropropagazione in vitro del portinnesto 'Beaufort', con l'obiettivo di valutare i potenziali vantaggi di questa tecnica rispetto ai metodi di propagazione convenzionali. Questo studio accademico mira a offrire uno sguardo sull'opportunità che la micropropagazione possa offrire in termini di efficienza, uniformità e potenziale genetico del materiale vegetale, contribuendo così alla conservazione e all'ottimizzazione delle caratteristiche desiderabili nel portinnesto, comprese quelle che si possono ottenere con le tecniche di ingegneria genetica. L'indagine comparativa delle tecniche di propagazione rappresenta un

ulteriore passo verso una produzione agricola più sostenibile e innovativa, con ricadute significative nella gestione delle malattie delle colture e nel miglioramento delle pratiche agricole.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale di base utilizzato nelle diverse fasi (micropropagazione e proliferazione, poi trasformazione e rigenerazione) è stato ottenuto partendo da espianiti ottenuti dalla cultivar portinnesto di pomodoro selvatico Beaufort, appartenente alla linea di portinnesti De Ruiters (Bayer), e derivanti da semi sterilizzati e successivamente trasferiti su terreno di coltura per la germinazione in vitro.

Tutti i procedimenti sono stati effettuati utilizzando gli strumenti e le cappe a flusso laminare del laboratorio di Arboricoltura del dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università politecnica delle Marche. Ciò per garantire la sterilità del materiale vegetale, cercando di ridurre i rischi derivanti dalla contaminazione esterna da parte di agenti microbiologici quali funghi, muffe, lieviti, batteri ecc., che risultano inoltre un problema più impattante nella micropropagazione in vitro rispetto ai più comuni metodi di propagazione in suolo e fuori suolo.

3.1.1. Materiale vegetale per la sterilizzazione semi, germinazione e micropropagazione del pomodoro selvatico Beaufort

Sterilizzazione, semina e germinazione

I semi Beaufort sono stati sottoposti ad un protocollo di **sterilizzazione** preseminali in Falcon (50 semi per Falcon) utilizzando una soluzione di ipoclorito di sodio (NaClO) al 5% diluito in 200 ml di acqua sterile per 20 minuti (10 ml di NaClO). Dopo questo intervallo di tempo, i semi sono stati sottoposti a tre risciacqui successivi in Falcon con acqua deionizzata e microfiltrata sterile ad intervalli di 1, 5 e 10 minuti per rimuovere ogni traccia di NaClO, potenzialmente fitotossico nei confronti della germinazione dei semi e dei tessuti vegetali.

Dopo la sterilizzazione ed il risciacquo, la semina è stata immediatamente effettuata su piastre Petri (10 semi/petri) con terreno di coltura Murashige e Skoog MS0 (4,4 g L^{-1} sali MS con vitamine, 30 g L^{-1} di saccarosio, 7 g L^{-1} di agar, pH 5,7 aggiustato con KOH) seguendo lo schema di Figura 4. Successivamente, per stimolare la **germinazione**, le Petri sigillate con Parafilm sono state poste in camera di crescita con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, utilizzando illuminazione di $35 \mu mol m^{-2} s^{-1}$, ad una temperatura di $25 \pm 2^\circ C$.

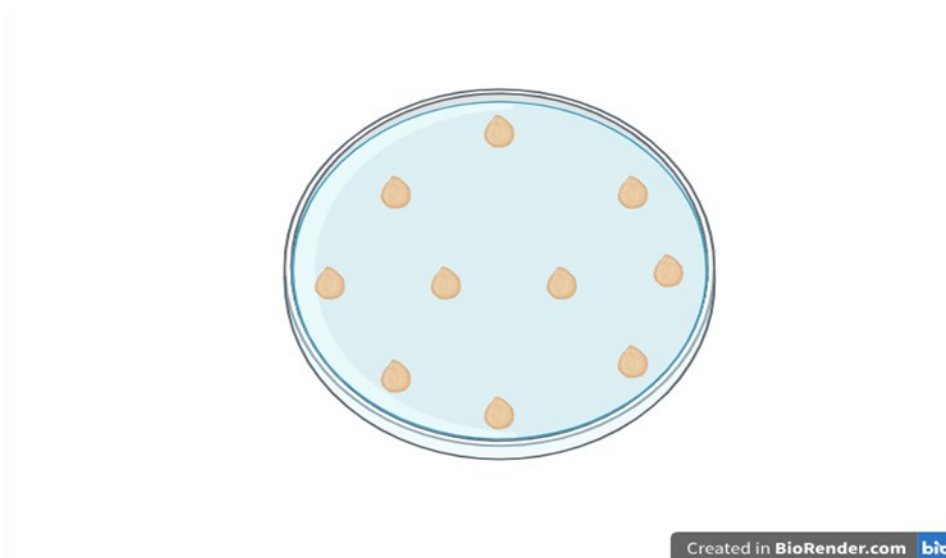


Figura 4: Schematizzazione semina di semi *Beaufort* in piastra Petri su terreno di coltura MS0 al giorno 0

Dopo 8 giorni dalla semina, le piante madri germinate e sviluppate in lunghezza del portinnesto di pomodoro selvatico sono state trasferite in un nuovo terreno MS0 in vaso di vetro, in modo da contenere l'eccessiva crescita all'interno delle piastre Petri. La fase di sterilizzazione dei semi e della germinazione in vitro ha permesso di verificare immediatamente l'eventuale presenza di contaminazioni, essendo certi di ottenere materiale sterile per l'inizio della proliferazione dei germogli ed evitando dunque l'applicazione di un protocollo di sterilizzazione per gli espianti.

Micropropagazione (proliferazione, allungamento e radicazione)

Dopo altri 10 giorni è iniziata la fase di micropropagazione, con le fasi di proliferazione, allungamento e radicazione. La proliferazione è iniziata prelevando dalle piantine il germoglio apicale e le gemme ascellari presenti all'ascella di ogni foglia con l'aiuto di un bisturi ed una pinza sterili e un contenitore di alluminio. Per questa operazione si è proceduto a sezionare la pianta in diversi segmenti (2 o 3 in media per pianta) direttamente all'interno del vaso, onde evitare di prelevare anche le radici ed il substrato attaccato ad esse: si è tagliata prima la parte apicale comprendente la gemma apicale ed eventuali foglie già sviluppate, per evitare il contatto di queste con il substrato durante il trasferimento dell'espianto in nuovo MS0, e si è lasciato circa 2 cm di caule da inserire poi nel nuovo terreno e dal quale sarebbe partita la radicazione. Sempre sulla stessa pianta si è

successivamente scesi nodo per nodo, eliminando la foglia soprastante il nodo e ponendo attenzione a non danneggiare la gemma ascellare al di sotto di questa, lasciando anche qui una lunghezza di circa 2-3 cm di fusto. Successivamente queste “talee” sono state velocemente inserite in MS0 in vaso di vetro in numero di 10 per vaso, inserendo le porzioni di fusto ad un massimo di 2 cm di profondità all’interno del substrato, per l’inizio delle fasi di proliferazione e radicazione, come in Figura 5.

Conseguentemente al veloce sviluppo dell’apparato radicale e soprattutto dell’allungamento verticale del fusto, questa operazione è stata ripetuta con intervalli di due/tre settimane, per evitare il contatto degli apici con il tappo del vaso che ha, come conseguenza diretta, un aumento del rischio di contaminazione del lotto.

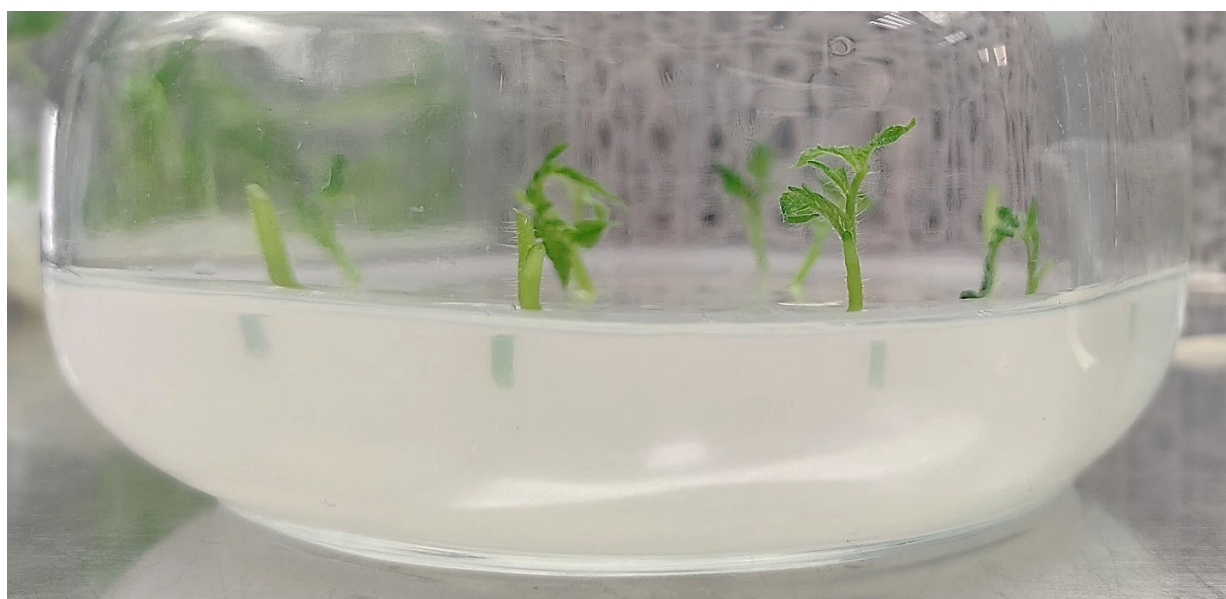


Figura 5: Espianti di portinnesto di pomodoro con gemme apicali o ascellari appena trasferiti in vitro su terreno MS0

La proliferazione, l’allungamento e la radicazione del portinnesto Beaufort sono state studiate e attuate utilizzando un terreno MS0 privo di input ormonali, con l’intento primario di valutare la capacità di crescita e di moltiplicazione del portinnesto in assenza di stimoli esterni. Il terreno MS0 offre un ambiente controllato e standardizzato per la crescita delle piante, permettendo di osservare l’effetto intrinseco delle condizioni di crescita sulla proliferazione del portinnesto. L’assenza di ormoni nel substrato è stata scelta per diverse ragioni. In primo luogo, un lavoro precedente il gruppo di lavoro del laboratorio di Arboricoltura del Dipartimento di Arboricoltura dell’Università Politecnica delle Marche aveva già mostrato come il portinnesto di pomodoro Beaufort non necessitasse composti a base di citochinine come la benziladenina (BA), la kinetina, e la zeatina per stimolare la proliferazione dei germogli. Anche la radicazione è stata facilmente ottenuta senza dover utilizzare substrati arricchiti di auxine, come acido indol-3-butirrico (IBA), l’acido naftalenacetico (NAA) e l’acido indol-3-acetico (IAA). La grande vigoria del portinnesto selvatico e le caratteristiche di sviluppo di questa pianta possono essere la motivazione della capacità di sviluppare in vitro un apparato aereo-radicale ottimale anche senza l’aggiunta di regolatori di crescita. Oltre a ciò, l’uso di terreni privi di ormoni consente di

ridurre la variabilità delle risposte ormonali indotte artificialmente, permettendo così di analizzare come il portinnesto Beaufort si adatta e prolifera in condizioni di crescita più naturali. Questo approccio si concentra sullo studio delle capacità di crescita autonome del portinnesto, eliminando l'uso di ormoni esogeni per evitare influenze che potrebbero alterare i risultati in modo non rappresentativo delle caratteristiche naturali della pianta. L'assenza di stimolanti ormonali consente di osservare direttamente i processi endogeni responsabili della proliferazione e della formazione di nuove strutture. In questo modo, qualsiasi risposta di crescita o differenziazione riscontrata può essere attribuita esclusivamente alle qualità intrinseche del portinnesto e alle condizioni ambientali in cui cresce. Questa scelta metodologica permette di ottenere una visione più chiara dei meccanismi fisiologici e molecolari legati alla crescita e alla radicazione, semplificando la sperimentazione nelle fasi iniziali, con l'obiettivo di stabilire una base solida, su cui eventualmente introdurre successivamente ormoni specifici per approfondire lo studio.

Ambientamento

L'ambientamento delle piantine ottenute da micropropagazione rappresenta una fase cruciale del processo di trasferimento da un ambiente in vitro altamente controllato a condizioni di crescita ex vitro. Questa fase è stata condotta utilizzando contenitori alveolati 45 fori, riempiti con una miscela di torba bruna e bionda, selezionata per fornire un substrato adeguato al supporto e al drenaggio delle piantine. Dopo circa due settimane dall'inizio della proliferazione, e successivamente alle fasi di allungamento e radicazione in vitro, un totale di 30 piantine è stato trasferito nei contenitori alveolati, posti all'interno di un tunnel di plastica collocato in serra (Figura 6).

Il passaggio da colture in vitro a condizioni ex vitro comporta notevoli cambiamenti ambientali, in particolare la riduzione dell'umidità e l'esposizione a stress abiotici, come la traspirazione elevata e il rischio di disidratazione. Le piantine, provenendo da un ambiente in vitro caratterizzato da umidità costante e regolata, una cuticola poco sviluppata e stomi scarsamente funzionali, necessitano di un'acclimatazione graduale per evitare stress fisiologici e garantire la loro sopravvivenza.

La procedura di trapianto è stata condotta con attenzione per preservare la sterilità: le piantine sono state manipolate utilizzando pinze e bisturi sterilizzati, con i contenitori e il substrato rigorosamente sterili, per minimizzare il rischio di contaminazioni batteriche o fungine, particolarmente elevato e rischioso in questa fase di transizione.

Dopo il trapianto, il tunnel è stato chiuso ermeticamente e sulla superficie interna del telo in plastica è stata nebulizzata acqua per creare un ambiente saturo di umidità per riprodurre le condizioni dell'ambiente in vitro, evitando la disidratazione delle piantine nelle prime fasi di acclimatamento. La saturazione dell'ambiente con vapore acqueo consente di limitare la perdita d'acqua dalle foglie, facilitando un adattamento fisiologico progressivo.

Il tunnel è rimasto completamente chiuso per una settimana con teli ombreggianti della serra per evitare un'eccessiva temperatura e luminosità, mantenendo così un'umidità relativa prossima al 100%. Trascorsa la prima settimana, è stato aperto un lato del tunnel di circa 10 cm per permettere una graduale riduzione dell'umidità, favorendo l'abituazione delle piantine alle condizioni esterne. Dopo tre giorni, il tunnel è stato aperto per metà, consentendo un'ulteriore diminuzione dell'umidità e l'aumento del ricambio d'aria. Infine, trascorsi altri tre giorni, il tunnel è stato completamente rimosso. A questo punto, le piantine sono considerate completamente acclimate e in grado di sostenere la normale traspirazione e crescita in condizioni esogene. Questo approccio progressivo nella riduzione dell'umidità è essenziale per garantire la sopravvivenza e il buon sviluppo delle piantine micropropagate, poiché consente loro di adattarsi gradualmente alle condizioni esterne, evitando fenomeni di shock idrico e fisiologico.



Figura 6: Tunnel con telo in plastica all'interno della serra, dove è stato fatto l'ambientamento

3.1.2. Materiale vegetale prove di trasformazione e rigenerazione

Nella finestra temporale della fase di proliferazione e “mantenimento” è stato ottenuto il materiale vegetale necessario per le successive fasi di trasformazione, rigenerazione e selezione.

In particolare, sono stati selezionati espianti fogliari di 1x1 cm prelevate dai germogli nella fase di allungamento. La scelta è ricaduta sulle foglie apicali, con tessuti più giovani e ben sviluppate, prive di imperfezioni come clorosi, scolorimenti per assenza di clorofilla, presenza di arricciamenti o necrosi. Queste sono state prima tagliate sotto cappa direttamente all'interno del vaso attraverso l'ausilio di una pinza e un bisturi sterili e,

successivamente, poste in un contenitore in alluminio sterile dove sono stati ricavati gli espianti di circa 1 cm^2 . Questi sono stati poi velocemente trasferiti su nuovo substrato di rigenerazione LRSM in Petri con il lato abissale posto verso l'alto (pagina superiore appoggiata sul substrato), onde evitare un'eccessiva disidratazione dei tessuti e conseguente perdita di turgore cellulare, particolarmente veloce in pomodoro in condizione di micropropagazione in vitro, per via dei tagli effettuati sulla pagina inferiore e del fatto che, in vitro, gli stomi delle foglie permangono sempre aperti.

3.2 Composti chimici utilizzati

Per le diverse fasi riguardanti la rigenerazione e trasformazione sono stati utilizzate diverse soluzioni di stock ormonali e antibiotici:

Regolatori di crescita (PGR)

- **IAA** (0,1 mg/mL), preparazione: dissolvere 10 mg di acido indol-3-acetico (IAA) in 10 ml di solvente etanologico (99.5% etanolo o metanolo) per ottenere una soluzione madre di 1 mg/ml. Mescolare la soluzione fino a completa dissoluzione. Filtrare attraverso un filtro sterile da 0.22 μm in un contenitore sterile da 50 ml. Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi.
- **6-BAP** (1 mg/L), preparazione: sciogliere 10 mg di benziladenina (BAP) in 10 ml di solvente etanologico (99.5% etanolo o metanolo) per ottenere una soluzione madre di 1 mg/ml. Agitare fino a completa dissoluzione del BAP. Filtrare la soluzione attraverso un filtro sterile da 0.22 μm in un contenitore sterile da 50 ml. Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi.

Antibiotici

- **Rifampicina** (100 mg/ml), preparazione: aggiungere 500 mg di Rifampicina in polvere in 10 ml di DMSO (o altro solvente appropriato come metanolo). Mescolare la soluzione utilizzando un agitatore magnetico fino a ottenere una soluzione omogenea. Filtrare la soluzione attraverso un filtro sterile da 0,22 μm in provette Eppendorf da 1,5 ml. Conservare le aliquote a -20°C al riparo dalla luce per un massimo di 6 mesi.
- **Kanamicina** (50 mg/ml), preparazione: mettere 500 mg di polvere di rifampicina in 10 ml di DMSO e mescolare sull'agitatore magnetico fino ad avvenuto scioglimento. Utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Epperndorf da 1,5 ml. Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi;
- **Spectinomicina** (50 mg/ml), preparazione: aggiungere 1 g di polvere in 10 ml di acqua deionizzata (Milli-Q) e mescolare con l'agitatore magnetico fino all'ottenimento di una soluzione omogenea. Utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Epperndorf da 1,5 ml. Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi;
- **Gentamicina** (50 mg/ml), preparazione: porre 500 mg di kanamicina monosolfato in polvere in 10 ml di acqua Milli-Q e lasciar sciogliere sull'agitatore magnetico. Utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Epperndorf da 1,5 ml. Conservare per un massimo di 6 mesi a -20 °C;

- **Cefotaxime** (400 mg/ml), preparazione: sciogliere 1 g di polvere in 10 ml di acqua deionizzata (Milli-Q) tramite agitatore magnetico. Utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Eppendorf da 1,5 ml. Conservare a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 6 mesi.
- **Acetosiringone** ($\mu\text{L}/\text{mL}$), preparazione: posizionare 100 mg di acetosiringone in polvere in 5 ml di etanolo puro e lasciare che l'acetosiringone si dissolva agitando. Utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Eppendorf da 1,5 ml. Conservare a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 6 mesi.

3.3 Substrati di coltura

La preparazione dei substrati ha richiesto l'uso di una bilancia di precisione, un agitatore magnetico e svariati pezzi di vetreria da laboratorio, tra cui Baker, cilindri graduati e bottiglie in vetro Pyrex con guarnizioni sui tappi, adatte per la sterilizzazione in autoclave. Dopo aver preparato le soluzioni e aggiunto i PGR non sensibili al calore, si è proceduto con un ciclo di autoclave a pressione di vapore. Questo ciclo sterilizza i terreni e la vetreria a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 20 minuti, a una pressione di 1 *bar*. Al termine del ciclo, quando i terreni sono ancora liquidi e raffreddati ad una temperatura che va dai 45 a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, si aggiungono i PGR e gli antibiotici caratterizzati da termolabilità, sotto una cappa a flusso laminare orizzontale per prevenire contaminazioni.

Substrati di proliferazione e radicazione

Per le fasi di proliferazione e radicazione della micropropagazione degli espianti di pomodoro della cultivar portinnesto Beaufort è stato preparato e utilizzato un terreno Murashige e Skoog MS0 (4,4 g L^{-1} sali MS con vitamine, 30 g L^{-1} di saccarosio, 7 g L^{-1} di agar, pH 5,7 aggiustato con KOH), come in Tabella 1.

Tabella 1: Substrato utilizzato per la proliferazione e radicazione

Substrato	MS + Vit [g L^{-1}]	Saccarosio [g L^{-1}]	Plant agar [g L^{-1}]	pH
		4,4	30	7

Substrato di rigenerazione (LRM)

Nell'ambito delle prove di rigenerazione, nella fase intermedia intercorsa tra il taglio degli espianti fogliari e l'inoculo batterico per l'inizio della trasformazione (2 giorni), è stato impiegato un substrato arricchito con una miscela di sali e vitamine secondo il protocollo MS (Murashige e Skoog, 1962) con aggiunta di 30 g/L di saccarosio, 7,5 g/L di agar per piante (Duchefa) e vari regolatori di crescita (PGR) in combinazioni specifiche come descritto nella Tabella 2. Il pH del substrato è stato aggiustato a 5,7 utilizzando HCl o KOH a diverse concentrazioni molari in relazione al volume di terreno da preparare, seguito da un processo di sterilizzazione in autoclave a una pressione di 1 *bar* e una temperatura di $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 20 minuti.

Tabella 2: Terreno impiegato nella prima fase di rigenerazione

Substrato LRM	MS + Vit [g L ⁻¹]	Saccarosio [g L ⁻¹]	Plant agar [g L ⁻¹]	pH	PGR [mg L ⁻¹]	
					6-BAP	IAA
	4,4	30	7	5,7	2	0,1

Substrati per prove di trasformazione

Le diverse fasi di trasformazione hanno richiesto diversi tipi di terreni di coltura, come descritto dalle Tabella 3, Tabella 4 e Tabella 5; durante l'esperimento di trasformazione, sono stati infatti preparati vari tipi di terreni di coltura, ciascuno con una formulazione specifica in base alla loro destinazione di impiego. I protocolli di trasformazione e rigenerazione hanno previsto l'utilizzo di diversi substrati, tra cui quello per la crescita delle colonie batteriche (terreno di inoculo, Tabella 4), e quelli specifici per la trasformazione mediata da *A. tumefaciens* (substrato d'infezione e di co-coltura, Tabella 3), una soluzione per il lavaggio dei tessuti post-infezione (LWS), substrati per la selezione e rigenerazione (Tabella 3, LRSM), ed infine per la proliferazione e radicazione dei germogli derivanti da callogenesi, con l'utilizzo di diversi PGR (Tabella 5).

Due substrati per l'allevamento delle diverse colonie batteriche di *Agrobacterium tumefaciens*, in relazione ai due ceppi utilizzati per trasferire i diversi costrutti genici disponibili per questa prova:

- a) per quanto riguarda il ceppo EHA105 contenente i costrutti Inteina (controllo) e Cp20 (peptide ciclico), è stato utilizzato il terreno di inoculo, LB, liquido e solido: 5 g/L di estratto di lievito, 10 g/L di triptone, 10 g/L NaCl, 7 g/L di bacto agar (solo per il terreno solido), pH 7.2 (tamponato con NaOH). Gli antibiotici sono stati inseriti dopo la sterilizzazione data la sensibilità al calore: rifampicina (50 mg/L) e kanamicina (50 mg/L);
 - b) per il ceppo GV301 contenente invece il costrutto RNAi Bc DCL1/2, è stato usato lo stesso mezzo LB solido e liquido inoculato però con una diversa combinazione di antibiotici: rifampicina (50 mg/L), spectomicina (50 mg/L) e gentamicina (50 mg/L);
- terreni per la trasformazione genetica dei tessuti vegetali:
 - terreno di infezione batterica, MS20: 4.4 g/L di MS con vitamine incluse, 20 g/L di saccarosio, pH 5.2 (tamponato con NaOH);
 - terreno di co-coltura (*A. tumefaciens* – foglie), MS0: 4,4 g/L di MS con vitamine, 30 g/L di saccarosio, 7 g/L plant agar, pH 5.7 (tamponato con KOH);

Terreno di selezione e rigenerazione (LRSM):

- A) prime tre settimane dopo la fase di co coltura: 4,4 g/L di sali MS con vitamine, 30 g/L di saccarosio, 7,5 g/L di agar per piante, con pH regolato a 5,7 tramite KOH. Sono stati inclusi i regolatori di crescita 6-BAP (pre-autoclave) e IAA (post autoclave), nelle quantità di 2 mg/L e 0,1 mg/L rispettivamente. Dopo

la sterilizzazione del mezzo e della bottiglia Pyrex, sono stati aggiunti gli antibiotici kanamicina e cefotaxime nelle concentrazioni di 50 mg/L e 400 mg/L.

- B) successive settimane: stesso terreno con concentrazione di kanamicina monosolfato di 100 mg/L. Però, trascorse le prime 3 settimane su LRSM B, è stata verificata un'eccessiva pressione sugli espianti in termini di necrosi dei tessuti fogliari, e si è dunque deciso di ristabilire per il resto della fase di rigenerazione e selezione il terreno LRSM A.
- terreno di **proliferazione, allungamento e radicazione** utilizzato per il trasferimento dei germogli rigenerati derivanti da callogenesi che necessitano l'utilizzo di PGR e di agenti di selezione ai fini della trasformazione, a differenza di quelli derivanti dalla micropropagazione in vitro di meristemi naturali come quelli apicali ed ascellari:
 - A) 4,4 g/L di sali MS con vitamine, 30 g/L di saccarosio, 7,5 g/L di agar per piante, con pH regolato a 5,7 tramite KOH. Aggiunta di 6-BAP ed IAA in concentrazione rispettivamente di 1 mg/L e 0,1 mg/L; di kanamicina monosolfato a 50 mg/L e cefotaxime a 400 mg/L;
 - B) una volta stabilizzata la fase di allungamento, la fase di radicazione è stata promossa trasferendo i germogli su terreno MS0 (4,4 g/L di MS con vitamine, 30 g/L di saccarosio, 7 g/L plant agar, pH 5.7 (tamponato con KOH);

Tabella 3: Terreni impiegati nelle varie fasi di trasformazione

	MS20	LRSM		MS0 Co-coltura
		A	B	
MS + Vit [$g L^{-1}$]	4.4	4.4	4.4	4.4
Saccarosio [$g L^{-1}$]	20	30	30	30
Plant Agar [$g L^{-1}$]		7.5	7.5	7.5
pH	5.2	5.8	5.8	5.8
Antibiotici [$mg L^{-1}$]				
Kanamicina		50	100	
Cefotaxime		400	400	
Regolatori di crescita (PGR) [$mg L^{-1}$]				

6-BAP		2	2	
IAA		0,1	0,1	

Tabella 4: Terreni di crescita batterica

	LB (solido)	LB (liquido)
Estratto di lievito [$g L^{-1}$]	5	5
Triptone [$g L^{-1}$]	10	10
NaCl	10	10
Agar per batteri [$g L^{-1}$]	15	
pH	7,2	7,2

In relazione ai diversi ceppi batterici contenenti i diversi costrutti (Inteina, Bc DCL1/2 e Cp20) da allevare, sono state usate diverse combinazioni di antibiotici sui terreni di crescita batterica LB solido ed LB liquido:

Antibiotici mg/L^{-1}	EHA 105		GV301
	INTEINA	Bc DCL1/2	CP20
Rifampicina	50	50	50
Kanamicina	50	50	
Spectomicina			50
Gentamicina			50

Tabella 5: Terreni di rigenerazione, selezione e accrescimento dei germogli trasformati

	A	B
MS + Vit [$g L^{-1}$]	4.4	4.4
Saccarosio [$g L^{-1}$]	30	30
Plant Agar [$g L^{-1}$]	7	7
pH	5.7	5.7

Antibiotici [$mg L^{-1}$]		
Kanamicina	50	
Cefotaxime	400	
Regolatori di crescita(PGR) [$mg L^{-1}$]		
6-BAP	1	
IAA	0.1	

3.4 *Agrobacterium tumefaciens*: ceppi, vettori e agenti selettivi

Nella prova di trasformazione sono stati utilizzati i ceppi di *A. tumefaciens* EHA105 e GV301 caricati rispettivamente con i plasmidi *pBIN19SP-2XFYVE-3XFLAG-Intein-CP20* (12.883 bp) e *phellsgate8* (17.486 bp). EHA105 con i costrutti esprimenti il peptide antimicrobico (cyclic peptide -CP20) e il controllo (Inteina); GV301 con il costrutto di silenziamento genico a forcina contro i geni *DCL1* e *2* di *B. cinerea* (Bc DCL1/2).

L'Inteina agisce come struttura di supporto del CP20, promuovendo la disposizione spaziale corretta del peptide affinché questo venga poi espresso; senza Inteina, infatti, si potrebbero avere delle strutture secondarie per cui alla fine, l'ingegnerizzazione genetica con il peptide risulta inefficace. Il CP20, appartiene alla categoria dei AMPs Ciclici, cioè peptidi che formano strutture cicliche a causa della presenza di legami covalenti tra i terminali amminici e carbossilici.

Le regioni codificanti presenti nel costrutto **CP20** inserito nel plasmide *pBIN19SP-2XFYVE-3XFLAG-Intein-CP20* sono costituite, come da Figura 7 e Figura 8:

Right border (RB):

- il promotore regolatore della trascrizione, il promotore del 35S di *CaMV* (Cauliflower Mosaic Virus), che controlla l'espressione del gene di interesse all'interno della cellula ospite;
- La sequenza 2xFYVE, costituita da due domini FYVE, che si legano ai lipidi di membrana per il reclutamento proteico;
- Il tag 3xFLAG è un marcatore proteico utilizzato per facilitare la purificazione e la rilevazione di una proteina di interesse nelle piante. Consiste in una sequenza di tre epitopi FLAG concatenati, che vengono aggiunti alla proteina target tramite ingegneria genetica. Questo tag consente di isolare e purificare la proteina di interesse utilizzando tecniche di affinità specifiche, come la cromatografia a scambio ionico o l'affinità per il tag FLAG;
- CP20 (AMPs);

- L'Inteina, nel contesto del costrutto con CP20 (AMPs), funge da supporto agendo come una sequenza di splicing proteico. Essa permette la rimozione automatica di una parte interna della proteina precursore, consentendo al CP20 di essere prodotto correttamente come proteina funzionale. Questo meccanismo è essenziale per garantire che il CP20 (antimicrobial peptides) venga rilasciato in forma attiva senza segmenti inutili, migliorandone l'efficacia;
- La sequenza terminatore *tNOS* che termina la trascrizione del gene di interesse e assicura che il trascritto sia correttamente processato.

Left border (LB):

- il gene *pNOS* (promotore del gene della nopalina sintasi) ottenuto da *A. tumefaciens*, è associato all'enzima nopalina sintasi, coinvolto nella biosintesi delle opinine. Usato come promotore della trascrizione dell'*NPTII*;
- il gene di resistenza alla kanamicina monosolfato *NPTII* transgenico, unico marcatore di selezione, che permette di distinguere le cellule trasformate in cui il T-DNA è stato correttamente inserito. Il marcatore di resistenza *neomicina fosfotransferasi II* (*NPTII*) è utilizzato per la sua grande efficacia nella selezione dei tessuti trasformati (Cappelletti *et al.*, 2015);
- La sequenza terminatore *tNOS*.

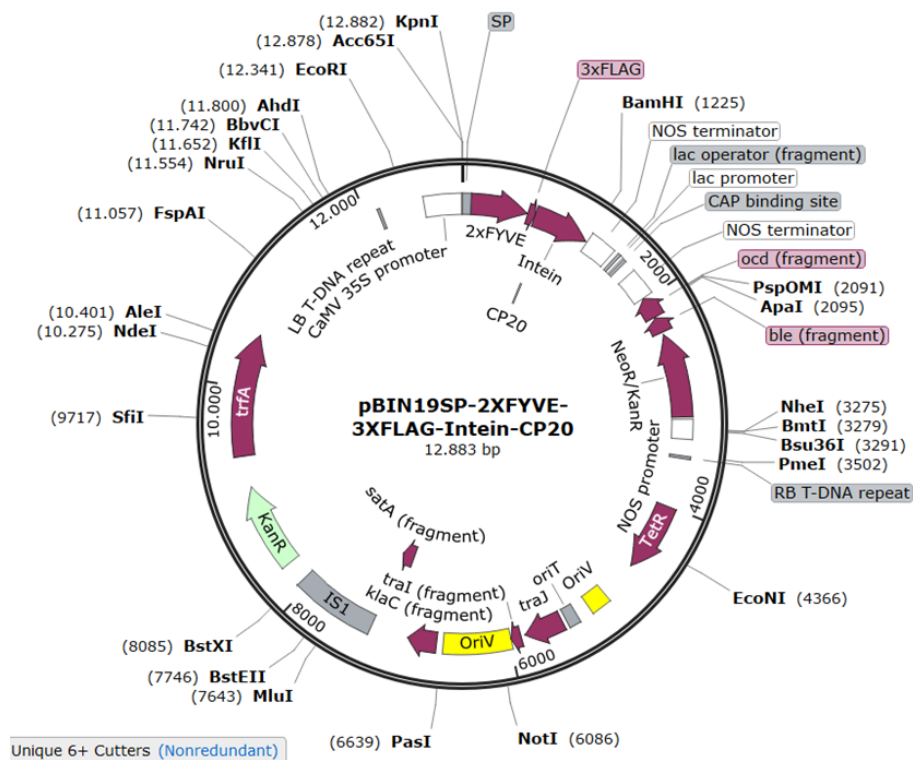


Figura 7: Plasmide pBIN19SP-2XFYVE-3XFLAG-Intein-CP20 esprime il peptide antimicrobico CP20 ingegnerizzato all'interno del ceppo di *A. tumefaciens* EHA105

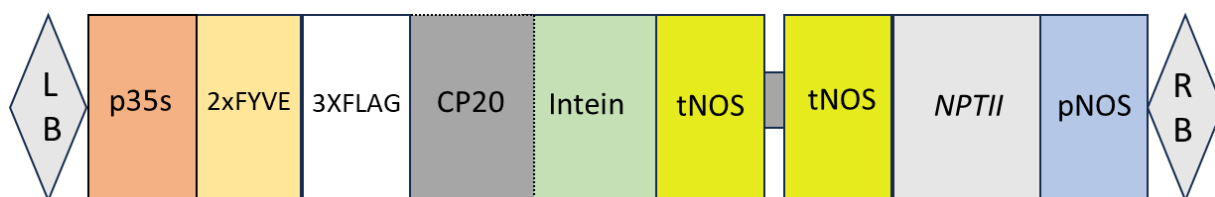


Figura 8: Cassetta genica del costrutto 35S::Intein-CP20

Le regioni codificanti presenti nel costrutto RNAi **Bc DCL1/2** inserito nel plasmide *phellsgate8* sono costituite, come in Figura 9 e 10, da:

Right border (RB):

- il promotore regolatore della trascrizione, il promotore del 35S di *CaMV* (Cauliflower Mosaic Virus), che controlla l'espressione del gene di interesse all'interno della cellula ospite;
- il gene di interesse *Bc-DCL 1/2*, chiamato Hairpin o gene a forcina: costituito da due sequenze complementari tra loro e inserite in maniera inversa nel costrutto, divise da una regione non codificante (introne). Quando trascritte le due sequenze unendosi formano una molecola di RNA a doppio filamento, e l'introne viene eliminato grazie all'attività dell'enzima DICER della cellula vegetale. Sono infatti utilizzati nelle tecniche di RNAi per silenziare l'espressione di geni target specifici.
- Terminatore della trascrizione *tOCS* o terminatore dell'ottopina sintasi, è una sequenza di DNA derivata dal plasmide pTi di *A. tumefaciens*. Assicura che la RNA polimerasi si stacchi correttamente dal DNA, prevenendo la trascrizione oltre il punto desiderato (Bevan *et al.*, 1983) e previene il trasferimento di geni indesiderati oltre il punto di terminazione, garantendo che solo il gene di interesse venga espresso (Depicker *et al.*, 1982).

Left border (LB):

- il gene *pNOS* (promotore del gene della nopalina sintasi) ottenuto da *A. tumefaciens*, è associato all'enzima nopalina sintasi, coinvolto nella biosintesi delle opinine. Usato come promotore della trascrizione dell'*NPTII*;
- il gene di resistenza alla kanamicina monosolfato *NPTII* transgenico, unico marcatore di selezione, che permette di distinguere le cellule trasformate in cui il T-DNA è stato correttamente inserito. Il marcatore di resistenza *neomicina fosfotransferasi II (NPTII)* è utilizzato per la sua grande efficacia nella selezione dei tessuti trasformati (Cappelletti *et al.*, 2015);
- La sequenza terminatore *t-NOS*.

3.5 Protocollo di rigenerazione e trasformazione

Sono state effettuate diverse prove utilizzando vari protocolli al fine di trovare quello più efficiente sia ai fini della trasformazione e sia della rigenerazione in vitro, anche in termini di contrasto alla crescita di *A. tumefaciens* nelle fasi post trasformazione. L'eccessiva contaminazione batterica all'interno delle piastre Petri nel primo mese dopo la co-coltura e delle microbox nei mesi successivi, infatti, è stato il fattore più limitante che ha portato alla ricerca di un protocollo stabile che garantisse la possibilità di lavorare con materiale vegetale sano, non inficiando lo sviluppo cellulare degli espianti fogliari con la produzione di calli e poi di germogli. Come protocollo base si è fatto riferimento ad un precedente lavoro svolto all'interno del laboratorio di Arboricoltura del dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università politecnica delle Marche dal gruppo biotech (ispirato a Vidya *et al.*, 1999; Faisal *et al.*, 2019), modificato però in diverse fasi (*A. tumefaciens* Optical density/OD, lavaggio tessuti post infezione, concentrazione antibiotici terreni LRSM, ricetta terreno di allungamento e radicazione germogli), prendendo spunto da studi scientifici in letteratura (Dulam *et al.*, 2022; Manoj *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2009).

Per rigenerazione delle piante ci si riferisce alla capacità morfogenetica delle cellule vegetali di rigenerare interi individui a partire da singole cellule, tessuti o organi attraverso processi come la formazione di callo, organogenesi o embriogenesi somatica. Questo avviene grazie a processi morfogenetici, che sfruttano la totipotenza cellulare per la creazione di nuovi tessuti. La morfogenesi può avvenire per via diretta (da tessuto somatico) o indiretta (da callo, da cellule in sospensione, da protoplasti). Questo processo è fondamentale per la propagazione vegetativa e le biotecnologie vegetali (Thorpe, 2007).

La rigenerazione in vitro delle piante sfrutta diversi tessuti, come foglie, ipocotili e radici, utilizzati come espianti per l'induzione del callo. Questi espianti, grazie all'ambiente di coltura ricco di auxine (CIM), subiscono un processo di dedifferenziazione che porta alla formazione del callo da cellule simili a quelle del periciclo. Successivamente, il callo viene generalmente trasferito su un terreno arricchito con citochinine (SIM) per stimolare la formazione di germogli, e dopo su un terreno ricco di auxine (RIM) per indurre la formazione di radici. È stato dimostrato che i germogli si originano principalmente da cellule progenitrici situate nello strato intermedio del callo. L'intero processo di rigenerazione (Figura 11) prevede normalmente un passaggio sequenziale degli espianti attraverso CIM, SIM e RIM, ognuno dei quali guida una fase specifica della rigenerazione, favorendo la proliferazione del callo e la differenziazione delle nuove strutture vegetative (Lee *et al.*, 2024).

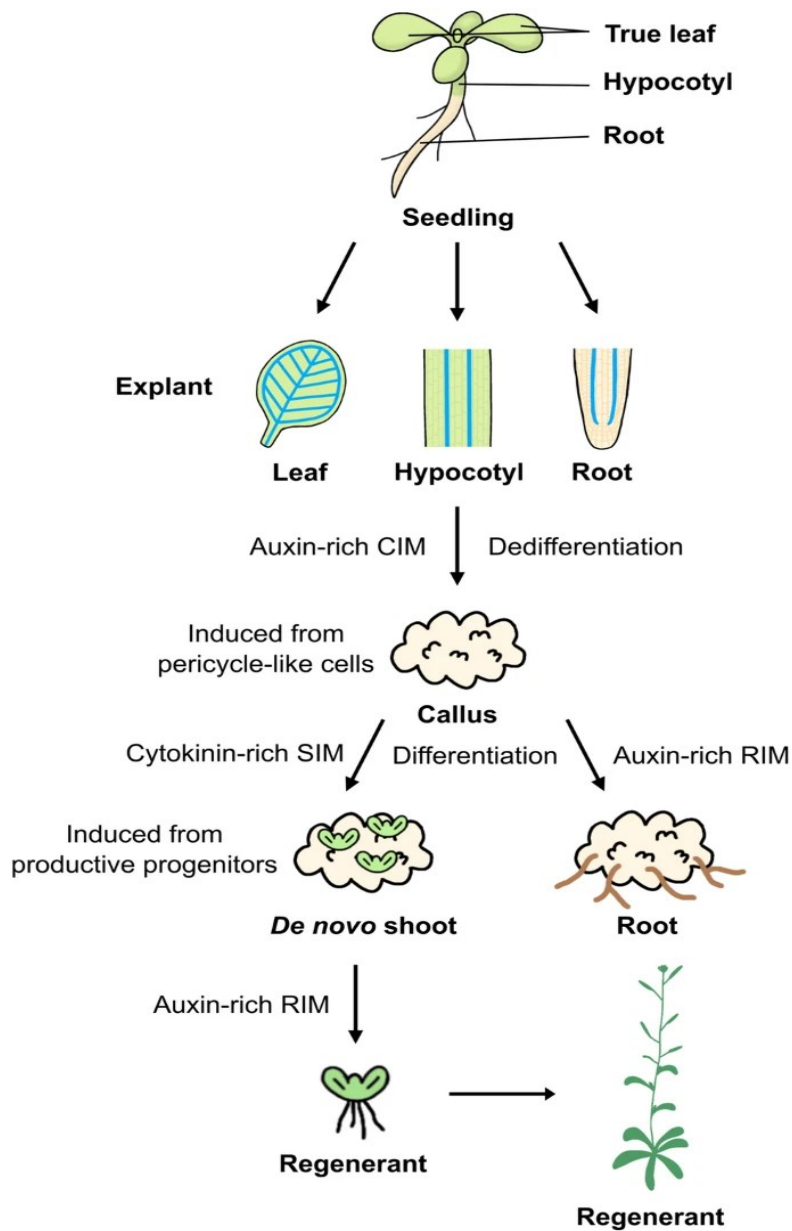


Figura 11: Schema del processo di rigenerazione (organogenesi) di piante in vitro (in Arabidopsis) (Lee et al., 2024)

Il protocollo comprende 7 fasi principali: (1) la preparazione dell'inoculo batterico e allevamento delle colonie, (2) il prelievo e la preparazione del materiale vegetale (espunti fogliari da germogli nella fase di allungamento in vitro), (3) l'infezione mediata dai diversi ceppi di *A. tumefaciens*, (4) la rigenerazione somatica e la selezione dei tessuti trasformati, (5) la fase di allungamento dei germogli ottenuti da callo, (6) la radicazione e (7) l'ambientamento.

Protocollo di trasformazione

1. Preparazione dell'inoculo e allevamento delle colonie

Dopo aver versato il mezzo LB solido (per la crescita delle colonie batteriche) in piastre Petri, si procede piastrando i ceppi EHA105 e GV301 di *A. tumefaciens*, crioconservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Le piastre inoculate vengono così incubate a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. Al termine del periodo di incubazione (Figura 12 A), singole colonie batteriche vengono selezionate e inoculate in tubi Falcon da 50 ml , contenenti 10 ml di terreno LB liquido con i rispettivi antibiotici: per EHA 105 rifampicina e kanamicina; per GV301 rifampicina, gentamicina e spectinomomicina (Figura 12 B).

I tubi di infezione vengono sigillati con pellicola para-film e messi in agitazione a 150 rpm , per 16 ore, alla temperatura di $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Per controllare la vitalità delle colonie batteriche e la loro proliferazione, viene misurata la loro concentrazione attraverso una lettura spettrofotometrica di campioni prelevati dai tubi di infezione ed inseriti in cuvette, utilizzando come controllo (bianchi) cuvette contenenti solamente LB liquido senza inoculo batterico (Figura 12 C). A questo punto, viene utilizzato come parametro di riferimento la Optical density (OD), cioè l'assorbanza della soluzione, a una lunghezza d'onda di 600 nm . In generale, viene considerata accettabile una OD compresa tra valori di 0,5 ed 1; nel caso della prova di trasformazione di questa tesi, è stata usata una OD piuttosto bassa di 0,5 per cercare di arginare i problemi legati alla contaminazione riscontrati nei tentativi di trasformazione e rigenerazione precedenti, quando è stata usata una OD di 0,8 e 1,0.

Constatato il valore di OD desiderato all'interno dei tubi di infezione Falcon attraverso lo spettrofotometro, si procede con la fase di pellettizzazione, nella quale la coltura in sospensione batterica viene centrifugata a 2500 rpm per 15 minuti, alla temperatura di $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Questa operazione viene fatta allo scopo di eliminare il surnatante e ottenere il pellet (Figura 10 D). Successivamente è stato risospeso il pellet aggiungendo 40 ml per Falcon di MS 20 con l'aggiunta di acetosiringone ai fini dell'attivazione dei geni di virulenza, in rapporto di $1\text{ }\mu\text{L mL}^{-1}$ ad un volume finale di $30\text{ }\mu\text{L}$ per tubo. In seguito, i tubi di infezione sono stati posti in agitazione a $100\text{-}150\text{ rpm}$ per 2 ore ad una temperatura $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per attivare l'*Agrobacterium*.

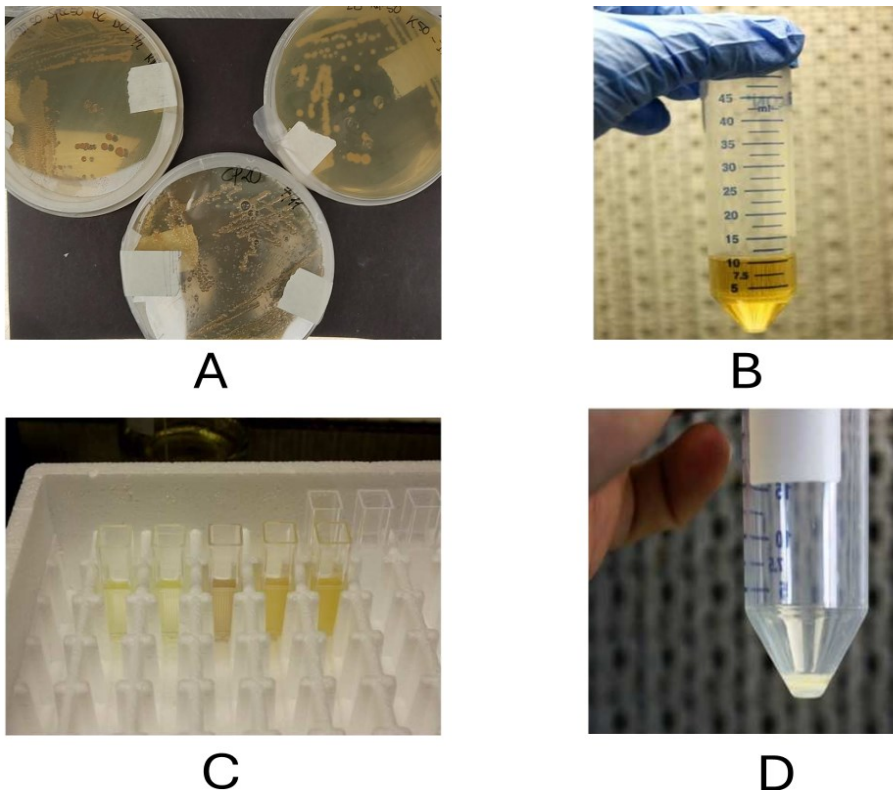


Figura 12: Fasi di coltura delle colonie batteriche e preparazione dell'inoculo: A) Coltura dei ceppi EHA 105 e GV301 di *A. tumefaciens* con i relativi costrutti su piastra dopo 48 di incubazione; B) Inoculo batterico; C) Lettura spettrofotometrica per verificare la crescita del batterio (OD); D) Pellettizzazione in seguito a centrifugazione e decantazione

2. Prelievo e preparazione del materiale vegetale

In letteratura, esistono diversi approcci nella scelta del materiale vegetale da utilizzare nelle prove di trasformazione e rigenerazione del pomodoro, in particolare la scelta verte essenzialmente tra espianti cotiledonari o fogliari, entrambi che rispondono più o meno efficacemente in termini di risposta trasformativa e di rigenerazione somatica (Rai, 2012). Nel caso di questa tesi, sono stati utilizzati espianti fogliari di 1x1 cm, provenienti da piante di pomodoro micropropagate in vitro in fase di allungamento, prediligendo le foglie situate nella parte apicale, quindi più giovani, con lamina espansa, ben formata, di medie dimensioni ed esente da difetti quali clorosi, perdita di clorofilla, arricciamenti e necrosi. Attraverso l'ausilio di un bisturi sterile, le foglie sono state distaccate e sono stati eliminati i piccioli, poi sono stati ricavati quadrati fogliari di 1 cm² che sono poi stati incisi con diversi tagli trasversali sulla faccia abassiale (pagina inferiore) in modo da interessare anche le nervature (ad eccezione di quella principale/centrale).

Immediatamente dopo, a causa della veloce disidratazione dovuta sia alle ferite e sia al fatto che le foglie in vitro hanno sempre tutti gli stami aperti, gli espianti sono stati trasferiti su terreno di rigenerazione LRM (MS 2 BAP, 0,1 IAA) come descritto in Tabella 2 in piastra Petri (10 espianti fogliari/Petri) per due giorni.

3. Fase di infezione mediata dai diversi ceppi di *A. tumefaciens*

Una volta trascorse le due ore di risospensione della soluzione batterica in 40 ml di MS 20 e acetosiringone (post pellettizzazione), gli espianti fogliari (dopo due giorni su terreno di rigenerazione) sono stati inseriti all'interno dei diversi tubi di infezione (50 espianti/Falcon) contenenti appunto i ceppi di *Agrobacterium* EHA105 (Inteina e CP20) e GV301 (Bc DCL1/2), posti in agitazione a 100-150 rpm per 15 minuti (tempo di infezione). Dopo l'infezione, gli espianti fogliari sono stati asciugati con carta da filtro sterile e trasferiti su terreno di co-coltura MS0 appositamente preparato in piastre Petri con un disco di carta da filtro sterile bagnato con 500 µL di soluzione liquida MS20 addizionata con acetosiringone e appoggiato sopra il terreno. Gli espianti sono stati trasferiti in numero di 10 per piastra, adagiando la pagina superiore sul terreno e lasciando la pagina inferiore rivolta verso l'alto. Le Petri chiuse sono state prima rivestite con pellicola di plastica e poi con carta argentata per creare la condizione di oscurità e successivamente sono state etichettate e poste in camera di crescita a 24 °C ± 1 °C per 48 ore.

Terminata la fase di co-coltura di 2 giorni, si è proceduto al lavaggio del materiale vegetale per eliminare l'*Agrobacterium*, attraverso 2 lavaggi ciascuno di 20 minuti all'interno di Falcon contenenti 40 ml di acqua sterile addizionata con 2 ml L⁻¹ di cefotaxime (160 µL in 40 ml acqua sterile) e in agitazione a 100-150 rpm.

Protocollo di rigenerazione e selezione

4. Rigenerazione somatica e selezione dei tessuti trasformati

Dopo il lavaggio post infezione gli espianti fogliari sono stati asciugati su filtri di carta sterile posti in contenitori di alluminio sotto cappa. Successivamente, sono stati trasferiti per le prime 3 settimane in Petri su terreno LRSM (A) (Figura 13), poi per altre 2 settimane su LRSM (B) in microbox per contrastare la contaminazione ma, dopo aver constatato l'eccessiva pressione selettiva dovuta all'alta concentrazione di kanamicina monosolfato, si è tornati a LRSM (A) in microbox con trasferimenti ad intervalli di 3 settimane. Gli espianti fogliari sono sempre stati posizionati mantenendo la pagina abissale verso l'alto nel numero di 10 foglie/microbox o Petri, e posti in camera di crescita con 16 ore di intensità luminosa pari a 70 µmol m²/s e 8 ore buio, a 24 °C ± 2 °C. Ad ogni trasferimento è coinciso un rilevamento dati attraverso l'osservazione con microscopio ottico ai fini di osservare la callogenesi dei tessuti vegetali, ed è stato eliminato il materiale vegetale contaminato (alto rischio contaminazione di tutto il contenitore) e quello che, per via della selezione, è risultato maggiormente necrotico. Sono stati immediatamente isolati in una nuova microbox gli espianti con calli che presentavano particolari caratteri morfogenetici (da rigenerazione fogliare) ritenuti interessanti, come forte intensità di verde

dell'ammasso cellulare (ben visibile soprattutto negli espianti che nel tempo evidenziavano perdita di clorofilla e imbrunimento dei tessuti) e, più avanti, presenza del primordio del germoglio.

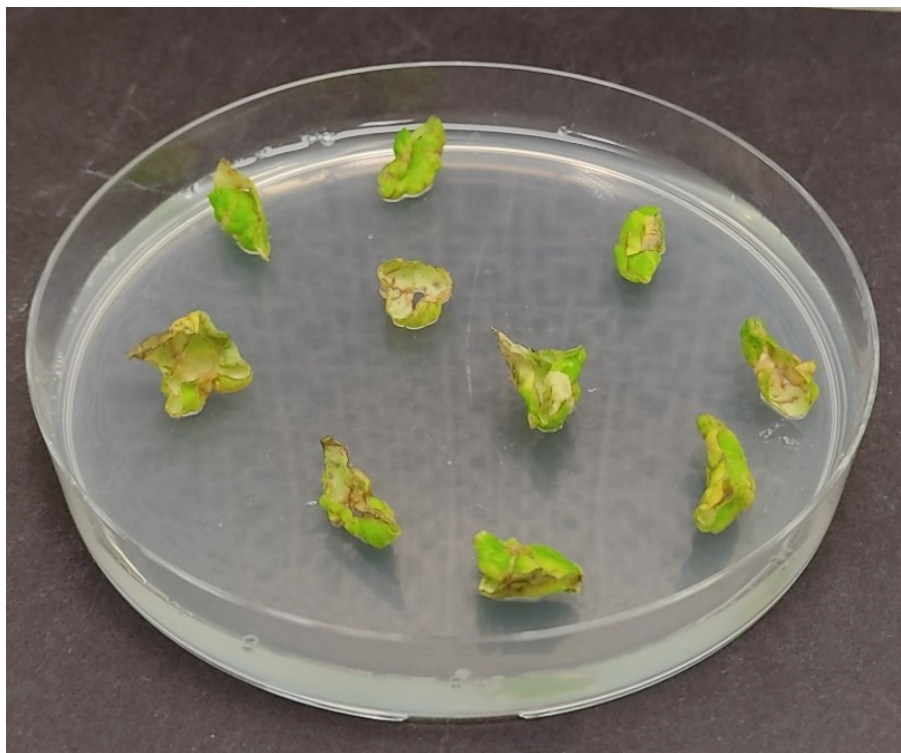


Figura 13: *Espianti fogliari posti su terreno di rigenerazione e selezione LRSM (A) dopo le 48 ore di co-coltura, subito dopo il lavaggio e l'asciugatura con filtri di carta sterili*

5. Fase di proliferazione e allungamento dei germogli ottenuti da callo

La fase di proliferazione e allungamento dei germogli derivati da callo è stata condotta in modo graduale e controllato, utilizzando terreni di coltura con diverse concentrazioni di regolatori di crescita, come riportato nella Tabella 5. Inizialmente, i germogli sono stati trasferiti su terreno MS arricchito con 1 mg/L di BAP (benzilaminopurina) e 0,1 mg/L di IAA (acido indolacetico) per favorire la proliferazione e l'allungamento. Rispetto ai substrati LRSM utilizzati nella fase precedente, la concentrazione di citochinine è stata ridotta per promuovere una crescita bilanciata. Nella fase iniziale di rigenerazione e selezione, le citochinine erano presenti a concentrazioni più elevate per indurre la formazione di germogli dal callo, mentre una riduzione della loro concentrazione in questa fase ha contribuito a prevenire la crescita eccessiva e disordinata dei tessuti.

Una volta avviato e stabilizzato il processo di allungamento, i germogli sono stati successivamente trasferiti su terreno MS privo di regolatori di crescita (MS0) per facilitare la radicazione. L'uso di una graduale riduzione delle concentrazioni di PGR (da 2 mg/L di BAP nel terreno LRSM a 1 mg/L nel terreno di proliferazione e allungamento) ha permesso di controllare il ritmo di crescita dei germogli, evitando fenomeni di iperplasia o sviluppo anomalo. Questo passaggio progressivo è cruciale anche per la futura radicazione, poiché la riduzione

delle citochinine ha contribuito a rimuovere il loro effetto inibitorio sulla rizogenesi, favorendo così la formazione di un sistema radicale sano e ben sviluppato.

3.6 Selezione del materiale trasformato e screening molecolare mediante analisi PCR

A causa dell'assenza di geni GFP all'interno dei costrutti genetici, la selezione dei rigenerati potrà essere confermata solo effettuando analisi PCR (*polymerase chain reaction*).

Come agenti di risposta alla selezione all'interno del mezzo di rigenerazione, sono stati utilizzati antibiotici, per rispondere alla presenza del gene *nptII* marcatore di resistenza all'interno del cassetto genico dei costrutti di interesse. Questo ha agito come marcatore di resistenza alla kanamicina monosolfato, inducendo processi necrotici nelle cellule vegetali che, non essendo trasformate, non portavano il gene di resistenza.

La kanamicina è stata addizionata in prova nella prima subcultura in LRSM (A) ad una concentrazione più bassa (50 mg/L^{-1}) rispetto ai terreni LRSM (B) usati nei trasferimenti delle successive due settimane (100 mg/L^{-1}), per via dell'alto livello di contaminazione batterica riscontrato inizialmente. Successivamente, si è notata un'eccessiva pressione selettiva dell'antimicrobico e si è tornati alla concentrazione iniziale dell'LRSM (A).

Lo screening molecolare per la conferma di avvenuta trasformazione è avvenuto solamente grazie alla PCR (Polymerase Chain Reaction), poichè nessuno dei costrutti utilizzati includeva l'ausilio di geni reporter come *gfp* o *gus*. L'analisi mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) è uno strumento fondamentale per il riconoscimento e la discriminazione dei germogli trasformati ottenuti da callogenesi. Questo approccio molecolare consente di identificare con precisione la presenza di geni specifici inseriti nel genoma vegetale durante il processo di trasformazione genetica, distinguendo così i germogli trasformati dai non trasformati o da eventuali rigeneranti somaclonali. La PCR si basa sull'amplificazione selettiva di una sequenza di DNA bersaglio attraverso l'uso di primer specifici, che delimitano la regione di interesse da replicare. Nello specifico, l'analisi richiede l'estrazione del DNA genomico dai tessuti dei germogli in esame, seguita dall'amplificazione del frammento target attraverso cicli ripetuti di denaturazione, annealing ed estensione, mediati da una DNA polimerasi termostabile (Mullis *et al.*, 1986).

La PCR è stata eseguita utilizzando due diverse polimerasi e differenti diluizioni del campione. I primer utilizzati per l'amplificazione del target genetico sono stati: primer forward 5'CAGAGTCCCGCTAGAAGAACTCGTCA3' e primer reverse 5'GGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAA3'. L'efficacia di questi primer nel discriminare i campioni trasformati è dovuta all'alta specificità e complementarità alla regione bersaglio, permettendo l'amplificazione solo nei campioni che contengono la sequenza genetica di interesse. Tre campioni diluiti in buffer di controllo sono stati preparati con diluizioni 1/2, 1/10 e 1/30. Per la reazione PCR sono stati utilizzati due master mix: Phire Tag DNA Polymerase, per il quale il master mix

finale era costituito da 20 μL (19 μL di master mix e 1 μL di campione), e Green Master Mix, in cui il master mix era di 25 μL totali (24 μL di master mix e 1 μL di campione), con la polimerasi già inclusa.

Il ciclo termico della PCR ha seguito le seguenti fasi (per la denaturazione, annealing ed estensione sono stati eseguiti 35 cicli):

- Denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti;
- Denaturazione a 95°C per 5 secondi;
- Annealing a 60°C per 30 secondi;
- Estensione a 72°C per 35 secondi;
- Estensione finale a 72°C per 3 minuti;
- Conservazione a 4°C fino all'analisi.

Le fasi operative sono iniziate con la preparazione del campione fogliare, che è stato tritato in un buffer di estrazione specifico. Successivamente, il campione è stato centrifugato a 13.000 giri/min per 5 minuti, separando il materiale più grossolano dal sovrantante contenente il DNA. Il campione è stato poi diluito in tre diverse concentrazioni: 1/2, 1/10 e 1/30, utilizzando un buffer specifico per tessuto vegetale. Queste diluizioni sono state ottenute mescolando il campione con acqua deionizzata sterile in proporzioni precise, per garantire una distribuzione omogenea del DNA.

La preparazione dei due master mix è stata eseguita con attenzione: per la polimerasi Phire Tag, sono stati preparati 19 μL di master mix a cui è stato aggiunto 1 μL di campione. Per il Green Master Mix, il protocollo prevedeva 24 μL di master mix e 1 μL di campione. I campioni positivi includevano DNA genomico vegetale che conteneva il gene *nptII* (marcatore di resistenza alla kanamicina presente nel costrutto Inteina), mentre i controlli negativi contenevano solo i reagenti, senza DNA. Le diluizioni sono state applicate sia per la polimerasi Phire Tag che per il Green Master Mix, nelle concentrazioni 1/2, 1/10 e 1/30, oltre al controllo positivo e negativo distintamente per Phire Tag e Green Master Mix.

Dopo la PCR, i campioni trattati con Phire Tag sono stati integrati con loading buffer, mentre per i campioni trattati con Green Master Mix non è stato necessario aggiungere ulteriori coloranti, poiché erano già inclusi nel master mix. Successivamente, i prodotti PCR sono stati caricati su un gel di agarosio al 1%, preparato con 125 ml di acqua distillata, 1,25 g di agarosio e 12,5 μL di Red Safe (dopo raffreddamento poiché termolabile). Questo intercalante fluorescente si lega al DNA, permettendo la visualizzazione delle bande sotto luce UV, senza gli effetti tossici (cancerogeni) dei coloranti tradizionali come il bromuro di etidio.

Infine, l'elettroforesi è stata condotta applicando una corrente elettrica al gel, che ha permesso la migrazione dei frammenti di DNA verso il polo positivo. I frammenti di DNA sono stati separati in base alla loro dimensione, con i frammenti più piccoli che migravano più rapidamente attraverso il gel. Al termine della corsa elettroforetica, le bande di DNA sono state visualizzate e documentate utilizzando un transilluminatore UV, per l'analisi finale dei risultati.

L'elettroforesi su gel di agarosio consente la visualizzazione delle bande di DNA corrispondenti alla sequenza amplificata (*nptIII* - 540 pb). Solo i germogli trasformati mostreranno la presenza della banda specifica, confermando l'integrazione del gene target nel loro genoma (Saiki *et al.*, 1988). Questo metodo è ampiamente riconosciuto per la sua precisione e sensibilità, rendendolo uno standard nella selezione e conferma dei germogli trasformati in laboratori di biotecnologia vegetale. La PCR rappresenta dunque un passaggio cruciale nel processo di screening, garantendo l'identificazione accurata dei germogli geneticamente modificati prima di procedere con ulteriori fasi di sviluppo o sperimentazione in campo.

3.7 Rilevazione e analisi dati

Sterilizzazione e germinazione

La rilevazione e analisi dei dati sono state condotte sui semi di portinnesto di pomodoro della varietà Beaufort, precedentemente sottoposti a sterilizzazione. L'analisi ha preso in considerazione sia la percentuale di vitalità che la possibile presenza di contaminazioni, oltre alla valutazione della percentuale di germinazione. La sterilità/vitalità e la germinazione dei semi sono state monitorate attraverso un ciclo di rilevazioni in quattro momenti distinti: nei primi tre giorni (T1, T2, T3) e successivamente dopo altri cinque giorni (T4). Questo approccio ha permesso di ottenere una visione temporale dettagliata, utile per identificare eventuali variazioni nel tasso di germinazione, nonché l'insorgenza di contaminazioni microbiche. I dati raccolti sono stati quindi analizzati in funzione del tempo, al fine di valutare l'efficacia del trattamento di sterilizzazione, la capacità dei semi di mantenere la loro vitalità e il loro potenziale di germinazione nel periodo considerato.

Proliferazione, allungamento e radicazione

Il rilievo e l'analisi dei dati relativi alla micropropagazione in vitro del pomodoro si sono concentrati su tre fasi principali: proliferazione, allungamento e radicazione. La rilevazione dei dati è stata condotta nel periodo compreso tra giugno 2023 e luglio 2024, ed è stata condotta nelle tre settimane intercorse tra l'inizio di ogni proliferazione e quello che è stato definito come limite della fase di allungamento (quando la maggior parte delle piantine giungono a contatto con il tappo del vaso). Come parametro per la proliferazione, è stato valutato il tasso di proliferazione, determinato dal numero medio di espianti (gemme apicali ed ascellari) prodotti per piantina in ciascun vaso. Successivamente, è stata analizzata la fase di allungamento, monitorando la velocità media con cui le piantine raggiungono il tappo del vaso. Nella fase di radicazione, è stato osservato l'inizio della formazione delle radici e calcolata la percentuale di radicazione, utilizzata per determinare la vitalità degli espianti. La percentuale di radicazione rappresenta un indicatore chiave per identificare gli espianti vitali e pronti per la fase successiva della coltivazione.

Non è stata valutata la percentuale di contaminazione dei vasi, poiché questa variabile è stata considerata direttamente dipendente da potenziali errori umani durante il processo di manipolazione e non riflettente le condizioni intrinseche della micropropagazione.

Oltre alle fasi classiche di proliferazione, allungamento e radicazione, particolare attenzione è stata posta sulle fasi di radicazione e ambientamento, fondamentali per le prove di confronto tra micropropagazione e coltivazione in vivo. Queste prove hanno avuto lo scopo di valutare la capacità delle piante micropropagate di adattarsi alle condizioni ambientali tipiche della coltivazione in campo aperto, confrontandole con quelle coltivate direttamente in vivo. La fase di radicazione è stata monitorata per assicurarsi che le piantine avessero sviluppato un apparato radicale sufficiente a garantire il loro successo nel successivo ambientamento, sia in vitro che in vivo.

Ambientamento

La rilevazione e l'analisi dei dati relativi all'ambientamento delle piantine in serra si sono focalizzate sulla valutazione della vitalità/mortalità delle stesse nelle prime fasi più critiche del passaggio da vitro a vivo. Tale valutazione è stata effettuata a intervalli specifici: una settimana dall'inizio dell'ambientamento in tunnel e a dieci giorni. Questi punti temporali coincidevano con le fasi di progressiva riduzione dell'umidità all'interno del tunnel di plastica, passaggi critici per l'adattamento delle piantine alle nuove condizioni ambientali. La vitalità è stata monitorata osservando parametri quali la turgidità fogliare, la crescita apparente e l'assenza di segni di necrosi o disseccamento, oltre che al controllo dello stato sanitario del materiale.

Trasformazione, rigenerazione e selezione

Successivamente alla fase di trasformazione, durante ogni trasferimento (ogni tre settimane), tutti gli espianti sono stati valutati visivamente, in modo da seguire l'evoluzione dei tessuti durante tutta la fase di selezione e rigenerazione somatica. Grazie all'utilizzo di un microscopio ottico, sono stati rilevati dati riguardo la percentuale di callogenesi (numero di calli), livello di necrosi, livello di contaminazione da *A. tumefaciens* e/o altri agenti microbiologici, e numero di germogli rigenerati per microbox o Petri (10 espianti/microbox o Petri), espressi in valore percentuale. I dati sono stati rilevati a partire dal primo trasferimento degli espianti sul terreno LRSM e ogni tre settimane con il trasferimento successivo.

3.7.1 Analisi statistica

Nel corso dell'analisi dei dati relativi alla micropropagazione e alla trasformazione genetica, è stata utilizzata una procedura statistica attenta per garantire risultati affidabili. Per i parametri della micropropagazione, ogni misura è stata calcolata con metodi specifici. La percentuale di sterilizzazione, ad esempio, è stata determinata calcolando il rapporto tra gli espianti sterilizzati con successo e il totale di quelli trattati, esprimendo il risultato in percentuale. Questo parametro aiuta a capire quanto sia stato efficace il processo di sterilizzazione.

Per quanto riguarda la germinazione, è stato misurato quanti espianti sono effettivamente germinati rispetto al numero di quelli seminati, sempre in percentuale. Questo dato fornisce un'indicazione chiara di come le condizioni sperimentali abbiano influenzato la germinazione. Il tasso di proliferazione in vitro, invece, riflette

la capacità degli espianti di produrre nuovi germogli o gemme, a partire dagli espianti originari, ed è un indicatore fondamentale per capire come gli espianti rispondono in un ambiente controllato.

La percentuale di radicazione è stata calcolata confrontando quanti espianti hanno sviluppato radici rispetto al totale di quelli trattati per la radicazione. Questo ci permette di valutare quanto il trattamento abbia stimolato lo sviluppo radicale. Complessivamente, questi parametri forniscono una base quantitativa per giudicare l'efficacia della micropropagazione e la qualità delle condizioni sperimentali.

Passando alla trasformazione genetica, lo studio si è concentrato sulla formazione del callo e sulla necrosi nei diversi costrutti: Inteina, Bc DLC1/2 e CP20. È stata eseguita un'analisi ANOVA per vedere se ci fossero differenze significative nell'efficienza di callogenesi e necrosi tra i vari costrutti. Successivamente, il test di Tukey ha aiutato a individuare più precisamente quali fossero le differenze tra i costrutti e quali fattori avessero un impatto maggiore sulla formazione del callo e sull'insorgenza della necrosi. I risultati sono stati poi rappresentati graficamente, facilitando la visualizzazione delle differenze tra i trattamenti e supportando le conclusioni tratte dall'analisi statistica.

Nel complesso, l'approccio adottato ha fornito un quadro chiaro e dettagliato delle performance dei vari protocolli, assicurando che le conclusioni fossero basate su dati affidabili e significativi.

CAPITOLO 4

RISULTATI E DISCUSSIONI

4.1 Sterilizzazione e germinazione semi

Sterilizzazione

Per le prime fasi di semina e successivi mesi di proliferazione sono stati utilizzati semi Beaufort non confettati (n.c.). Le fasi del protocollo di sterilizzazione sono descritte in Figura 14. Sono state calcolate le percentuali di sterilizzazione in Petri e, dopo 8 giorni, in vaso di vetro, analizzate in diversi momenti dopo la semina, la germinazione e le prime fasi di sviluppo di apparato aereo e radici ($t_1=1$ giorno, $t_2=2$ giorni, $t_3=7$ giorni, $t_4=8$ giorni, $t_5=14$ giorni). Le prime tracce di contaminazione (fungina) si sono verificate tra il t_4 e il t_5 (dopo il trasferimento in vaso) con il 9% del materiale contaminato, mentre complessivamente il 91% è stato poi usato come materiale di base per la proliferazione.

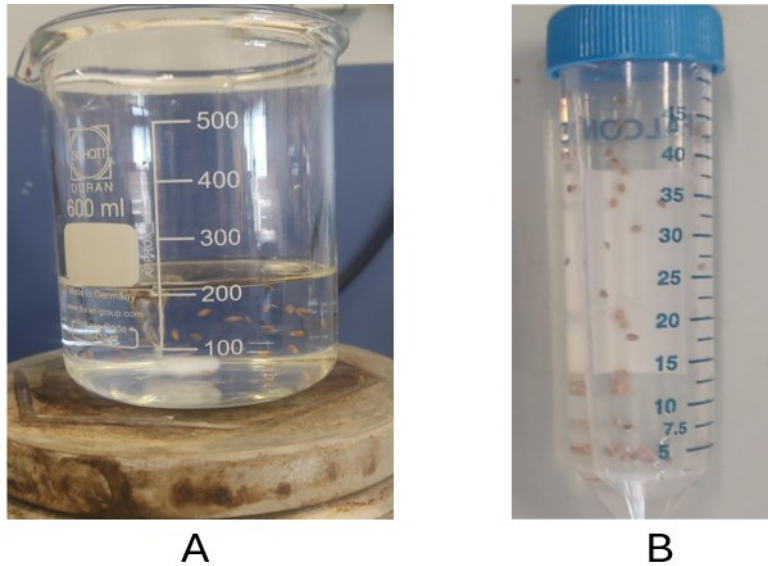


Figura 14: A) Fase di sterilizzazione in baker con NaClO al 5% in 200 ml di acqua deionizzata: B) serie di lavaggi in Falcon con acqua deionizzata per 10, 5 e 1 minuti)

Germinazione

La germinazione dei semi del portinnesto Beaufort è stata monitorata in condizioni controllate (camera di crescita con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 di buio, utilizzando illuminazione di $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ad una

temperatura di $25\pm 2^{\circ}\text{C}$) all'interno di piastre Petri sigillate con Parafilm, con un numero di 10 semi per ciascuna piastra. Questo ambiente protetto ha permesso di osservare il processo di germinazione in modo accurato (Figura 15) e di registrare i dati relativi alla percentuale di semi germinati nel corso del tempo (Figura 16).

Dopo un solo giorno dalla semina solo il 10% dei semi ha iniziato a germinare, rendendo la punta della radichetta visibile. Questo momento rappresenta una fase iniziale della germinazione, dove pochi semi hanno completato la fase di imbibizione e hanno cominciato a rompere il tegumento. Dopo 2 giorni, la percentuale di germinazione è aumentata significativamente al 57%. Questo incremento riflette il fatto che un numero maggiore di semi ha completato la fase di imbibizione e iniziato l'emergenza e allungamento della radichetta. Al giorno 3 la germinazione ha raggiunto il 64% con la maggior parte dei semi vitali che ha superato le prime fasi critiche della germinazione, con un ulteriore incremento moderato rispetto al giorno precedente. La germinazione ha seguito un andamento costante nei successivi 5 giorni, con un allungamento costante della radichetta e del caule con i cotiledoni all'interno delle Petri.

Dopo 8 giorni, il processo di germinazione è quasi completato, con una percentuale del 96% dei semi germinati. Questo indica che la quasi totalità dei semi ha completato il processo di germinazione, raggiungendo lo stadio in cui le plantule sono pronte per il trasferimento in nuovo substrato in vaso e per l'ulteriore sviluppo in condizioni controllate.

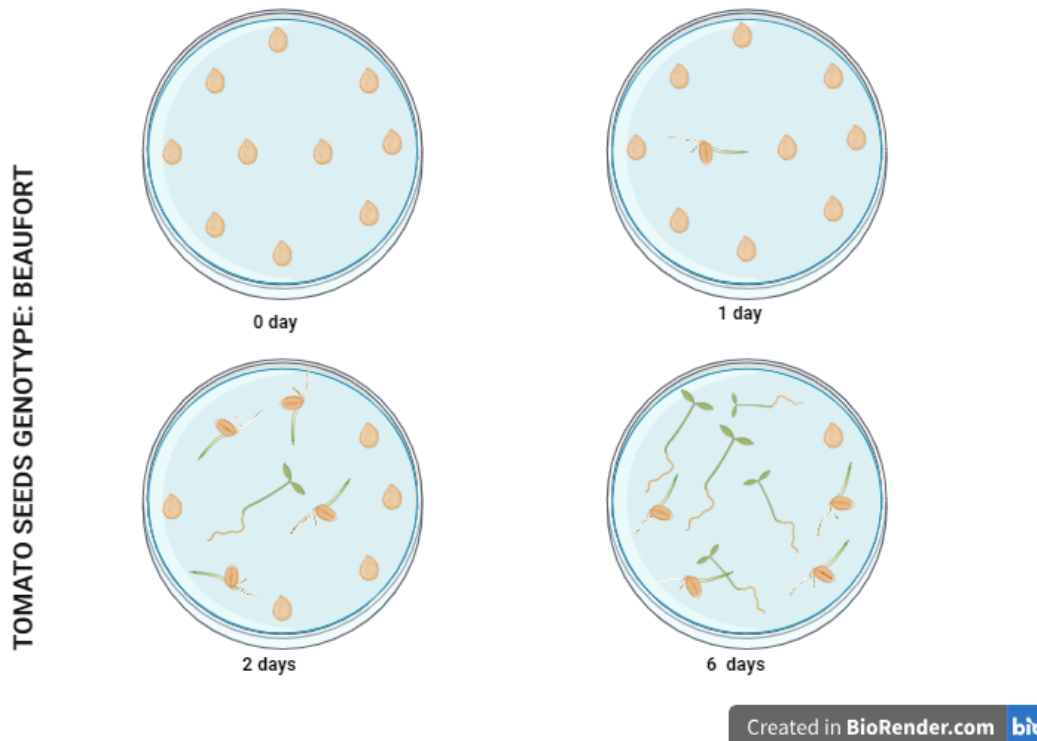


Figura 15: Schematizzazione germinazione semi Beaufort (10/Petri) dopo 0, 1, 2 e 6 giorni dalla semina su substrato MS0 in Petri

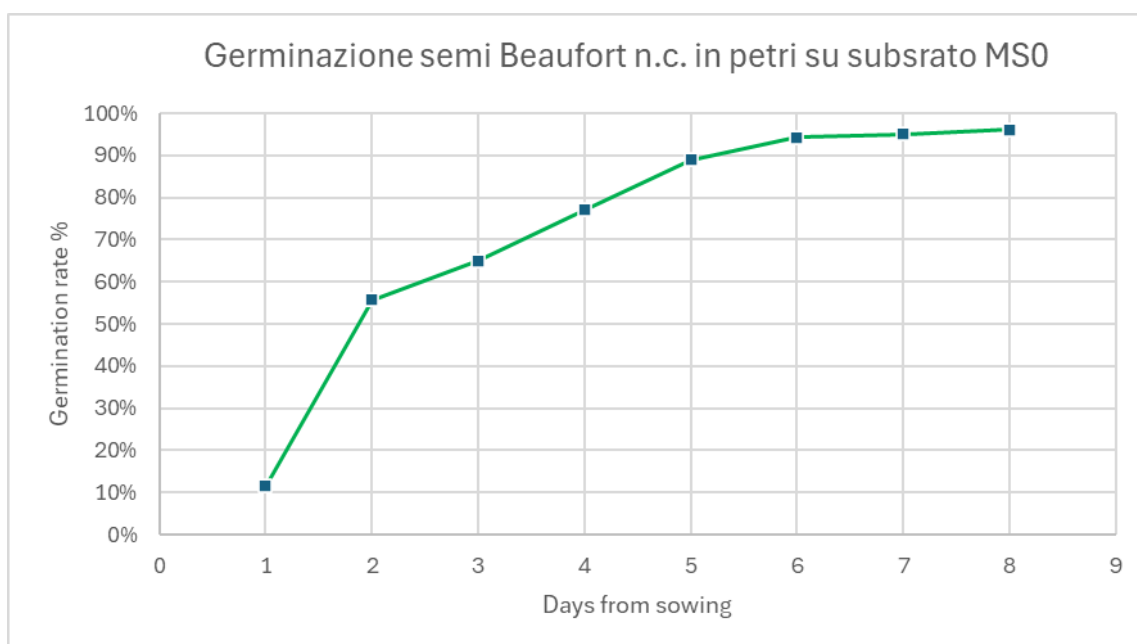


Figura 16: Tasso di germinazione semenzali Beaufort in Petri su terreno di coltura MS0 in diversi giorni post semina

Il processo di germinazione dei semi di Beaufort mostra una progressione rapida e significativa nei primi giorni, con un'accelerazione tra il secondo e il terzo giorno e un quasi completo raggiungimento del massimo potenziale di germinazione entro l'ottavo giorno. Questo andamento suggerisce un'alta vitalità dei semi e un'efficacia del metodo di germinazione in ambiente controllato all'interno delle piastre Petri, legato anche alla grande vigoria delle plantule, che dopo otto giorni hanno completamente invaso il contenitore. Visto il poco spazio di crescita ed il rischio di contaminazione dovuto al contatto delle plantule con il tappo della Petri, le piantine sono state trasferite in nuovo terreno MS0 in vaso di vetro per ottenere delle piante madri con crescita verticale adatte all'operazione di espanto delle gemme apicali ed ascellari per l'inizio delle fasi di micropropagazione.

4.2 Micropropagazione in vitro

Proliferazione, allungamento e radicazione

Le fasi della micropropagazione sono rappresentate in Figura 18 (A proliferazione, B allungamento e C radicazione). Durante la fase di proliferazione, è stata ottenuta una media di 2,6 nuovi germogli per piantina, partendo sia dalle gemme apicali che da quelle ascellari. Questo dato è stato ricavato considerando cicli di subcoltura di 2 settimane e trasferendo 10 gemme per vaso. Questo risultato è significativo considerando che non sono stati utilizzati regolatori di crescita durante l'intero processo, ma solo un substrato MS0 arricchito con vitamine. Il tasso di proliferazione è espresso dal grafico della Figura 17.

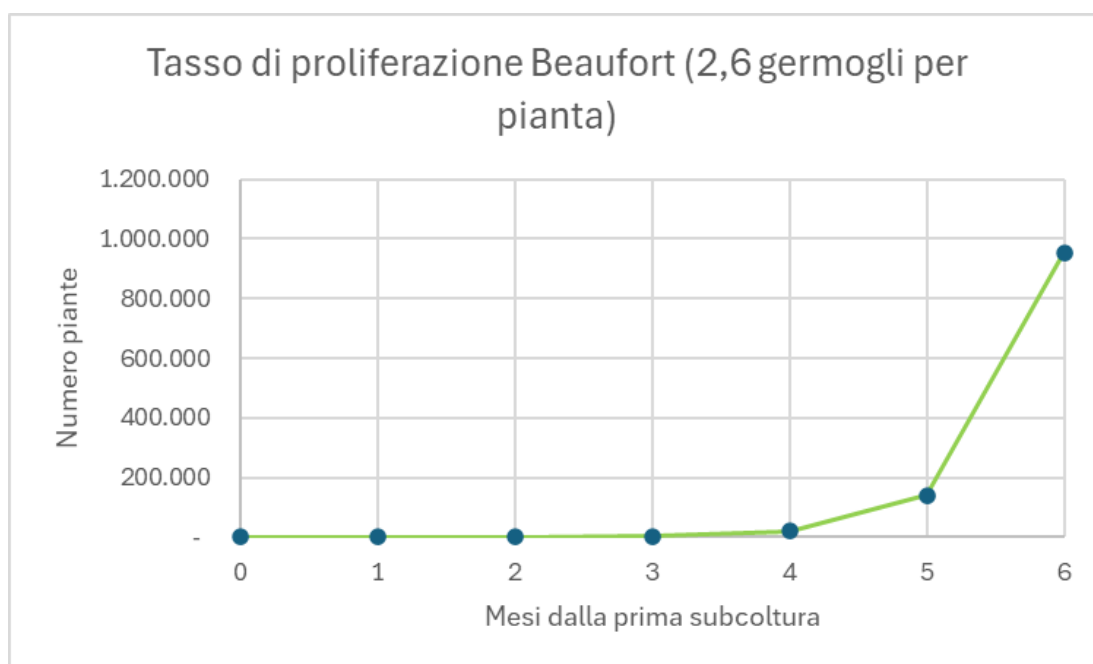


Figura 17: Tasso di proliferazione Beaufort (cicli di subcoltura di due settimane, 2,6 espianiti in media per pianta; 10 espianiti/vaso)

La morfologia di un germoglio di pomodoro in crescita, derivante da una gemma trasferita in vitro, presenta diverse caratteristiche distintive che possono essere osservate durante il processo di sviluppo. Il germoglio appare compatto e vigoroso, con una crescita eretta e simmetrica. È tipicamente verde brillante, indicando un buon livello di fotosintesi e salute della pianta.

Le foglie emergono in modo alternato lungo il fusto e sono di forma ovale-lanceolata con margini leggermente dentati; sono inizialmente piccole e tenere, con una superficie liscia e senza peli. Man mano che il germoglio cresce, le foglie si allungano e diventano più robuste, mantenendo una consistenza morbida.

Il fusto è sottile ma ben sviluppato, mostrando una certa flessibilità ma senza segni di fragilità. La colorazione è verde, con una leggera sfumatura più chiara verso la base, dove il fusto incontra il substrato. Non risultano segni di lignificazione in questa fase iniziale, in cui i tessuti sono ancora in una fase fenologica giovanile.

La gemma apicale è ben definita e prominente, mostrando un colore verde chiaro. È il punto di crescita attivo, da cui si sviluppano velocemente nuove foglie e internodi.

Le radici in fase iniziale sono bianche e sottili, emergenti dal nodo più basale del fusto. La radicazione in questa fase è ancora limitata, anche se gli apparati di tutti i germogli si espandono rapidamente attraverso le radici principali e secondarie, andando ad occupare, al momento della nuova subcoltura, buona parte del substrato.

Si sono saltuariamente osservate anomalie come ipertrofie o variazioni di colore dovute a clorosi, indicando che il processo di micropropagazione è stato condotto correttamente.

La morfologia dei germogli in crescita in questa fase iniziale è la stessa, indipendentemente se questi derivano da meristemi apicali o ascellari.

Il miglior modo di procedere per la subcoltura, in un contesto di produzione di massa aziendale, è di tagliare le gemme direttamente dentro il vaso, cercando di selezionare prima tutte le gemme apicali pianta per pianta, poi quelle del penultimo nodo (gemme ascellari all'ultimo nodo spesso troppo vicine al meristema apicale, con diametro molto sottile, non permettono di avere espunti di gemme apicali con una lunghezza di caule ottimale per la fase successiva del trasferimento in nuovo substrato), poi quelle del nodo successivo scendendo in direzione basipeta. Agire su ogni pianta singolarmente determina un maggior rischio di contaminazione dovuto al contatto di parti non sterili della pinza e del bisturi con materiale vegetale all'interno del vaso. Oltre a questo, la differenza di posizione delle gemme sulla pianta può risultare logisticamente sveniente per le fasi successive. Questo perché la velocità di inizio e crescita dell'allungamento e radicazione delle diverse gemme è leggermente diversa. Le gemme apicali si sono dimostrate le più veloci per l'inizio della proliferazione, radicazione e allungamento e di conseguenza quelle che raggiungevano i parametri ottimali per l'inizio dell'ambientamento nel minor tempo. La vigoria, intesa come velocità di inizio della proliferazione e radicazione e velocità di crescita dell'apparato aereo-radicale, è quindi legata alla posizione delle gemme sulla pianta e segue un andamento costante: in generale è stato osservato che le gemme ascellari basali (al primo nodo del germoglio), nonostante rispondessero comunque positivamente producendo i nuovi organi, erano le meno vigorose. Le gemme nei nodi successivi, invece, hanno una vigoria leggermente inferiore rispetto alle apicali, ma trascurabile nel contesto di un processo aziendale, in cui gemme in posizione mediana e apicale possono essere trasferite nello stesso terreno, senza impattare troppo sulla logistica (omogeneità del materiale all'interno dello stesso vaso al momento dell'ambientamento o di una eventuale nuova subcoltura). Dunque, è consigliabile trasferire le gemme del primo nodo basale nello stesso terreno, mentre le mediane e le apicali possono essere ambientate o usate per una nuova subcoltura anche contemporaneamente.

La risposta degli espunti al trattamento è stata estremamente positiva, con il 97% degli espunti che ha reagito favorevolmente, producendo nuovi germogli che poi si sono allungati ed hanno radicato. Questo alto tasso di successo indica che le condizioni sperimentali adottate sono state efficaci per promuovere la proliferazione anche senza l'ausilio di regolatori di crescita, evidenziando il potenziale del substrato MS0 nel supportare questa fase della micropropagazione e la grande vigoria del portinnesto selvatico di pomodoro.

Durante l'allungamento, la lunghezza media dei germogli utilizzata come parametro limite per considerare ottimale il momento della nuova subcoltura/ambientamento è stata di circa 12-13 cm (dal livello del substrato, non della base del tappo), poiché le piantine arrivavano all'altezza del tappo del vaso di vetro, aumentando il rischio di contaminazione. Il tempo necessario per raggiungere tale allungamento, come detto in precedenza, variava leggermente tra le gemme apicali e quelle ascellari mediane (1-2 giorni), mentre risultava dai 2 ai 6 giorni più lenta per i germogli derivanti da gemme ascellari del primo nodo basale. Questo significa che, inserendo le gemme tutte nello stesso substrato, si avranno germogli con un diverso grado di sviluppo e numero di gemme utilizzabili per la subcoltura successiva. Si è osservato che il contatto con il tappo del vaso avveniva

in media tra 14 e 21 giorni dall'inizio della subcoltura. Per questo si è considerato ottimale applicare cicli di subcoltura di due settimane.

Per quanto riguarda la radicazione, il tasso di radicazione è stato del 97% (percentuale di gemme che hanno proliferato e poi radicato rispetto a tutti quelli trasferiti in vitro), e tutti i germogli che hanno radicato si sono poi sviluppati più o meno vigorosamente in allungamento. I germogli meno sviluppati derivavano tutti dalla propagazione delle gemme ascellari basali, che crescendo più lentamente erano influenzate dalla crescita degli altri germogli in termini di competizione per la luce e di nutrienti, nonostante la parziale eterotrofia. È stato inoltre osservato che, nella quasi totalità dei casi, la mancata radicazione coincideva con l'assenza di proliferazione e allungamento, suggerendo una stretta correlazione tra questi fattori nello sviluppo degli espianti.

Il grafico della Figura 19 illustra il tempo medio necessario per l'inizio della radicazione. Dall'analisi effettuata su 5 vasi contenenti 10 gemme/germogli ciascuno, è emerso che dopo 3 giorni dall'inizio della proliferazione nessun espianto aveva iniziato a radicare; trascorsi 5 giorni, il 48% degli espianti aveva avviato la radicazione; al settimo giorno, la radicazione era avvenuta nell'86% degli espianti, mentre al quattordicesimo giorno tutti gli espianti avevano completato il processo.

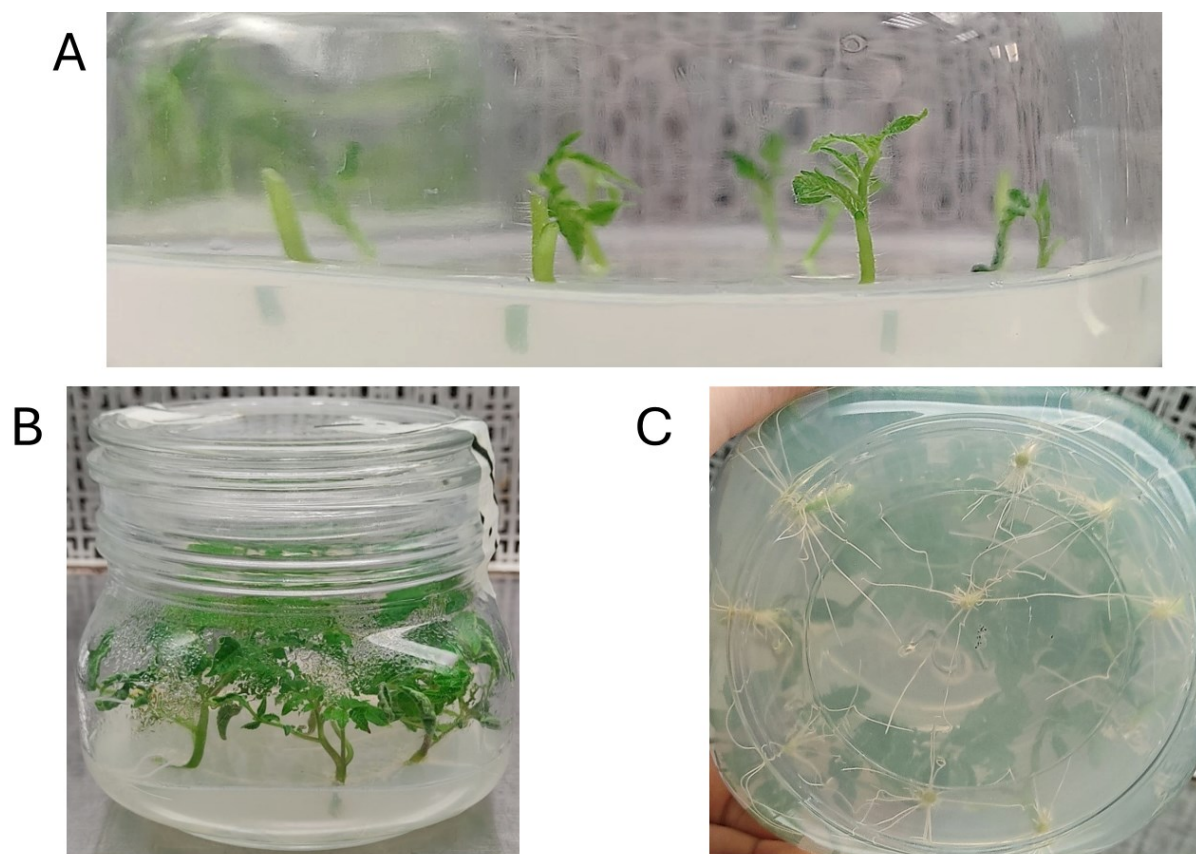


Figura 18: Fasi micropropagazione del portinnesto di pomodoro Beaufort (con gemme apicali ed ascellari) in vitro, particolare inizio proliferazione (A) (1 giorno dopo il trasferimento); allungamento parte aerea (B) e sviluppo radicale (C) (dopo 9 giorni dall'inizio della proliferazione)

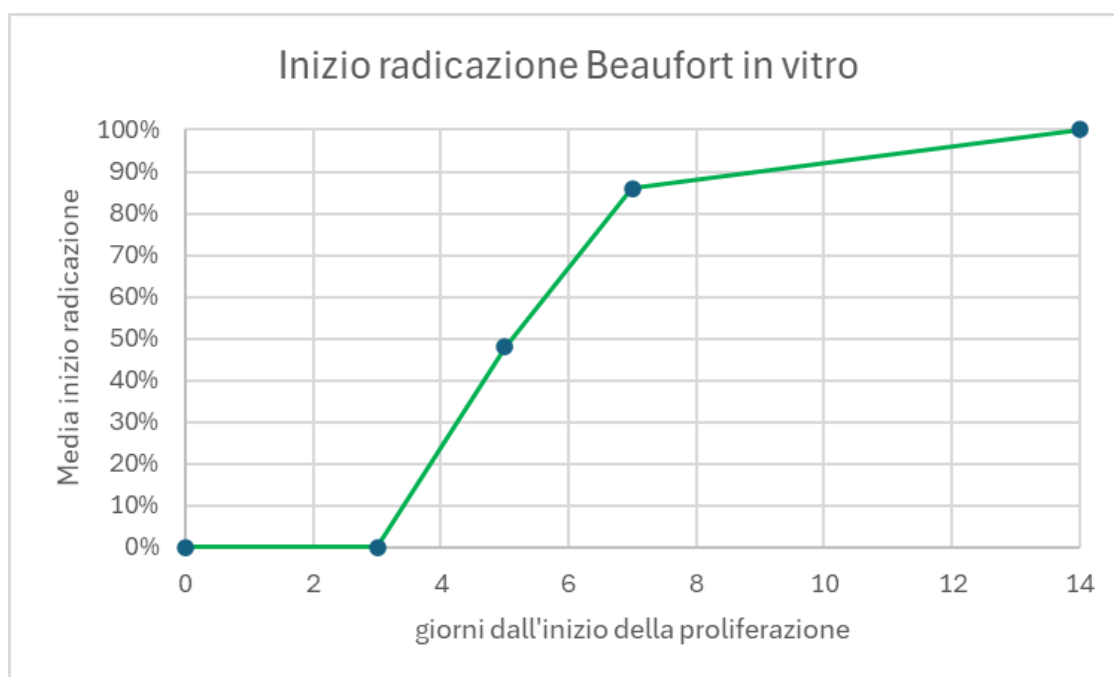


Figura 19: Inizio radicazione dei germogli apicali e ascellari dopo l'inizio della subcoltura, dall'inizio della proliferazione

Ambientamento

L'ambientamento del portinnesto di pomodoro Beaufort è stato oggetto di una prima prova sperimentale, caratterizzata da condizioni climatiche non ottimali. Durante il periodo dal 6 al 16 settembre 2024, le temperature sono state significativamente inferiori alla media, oscillando tra i 12 e i 18 gradi, rispetto ai valori tipici di settembre.

Questo ha rappresentato una sfida per il processo di acclimatamento delle piantine, specialmente nella fase di riduzione progressiva dell'umidità nel tunnel di plastica.

Dopo 7 giorni, su 30 piantine, 23 sono sopravvissute, corrispondenti al 76,7%, mentre a 10 giorni il numero di piante sopravvissute è sceso a 21, equivalente al 70%. È importante sottolineare che le piante sopravvissute erano in buono stato di salute, indicando una resilienza significativa nonostante lo stress ambientale. Questi risultati evidenziano la necessità di ulteriori ottimizzazioni nelle condizioni delle prove di ambientamento, ma confermano anche il potenziale positivo del processo di acclimatamento delle piantine.

4.3 Prove di trasformazione

Contaminazione da *A. Tumefaciens* post infezione

Gli espianti utilizzati per le successive fasi di rigenerazione, selezione, proliferazione, allungamento e radicazione dei germogli derivati dalla callogenese seguono il protocollo di trasformazione descritto nel paragrafo 3.6. Per garantire l'utilizzo di espianti privi di contaminazioni da *A. tumefaciens* post infezione, sono

state eseguite tre prove, al fine di trovare il protocollo di trasformazione più efficiente: la prima a dicembre 2023, la seconda a marzo 2024 e la terza a maggio 2024.

Nel corso delle sperimentazioni per la prova di trasformazione genetica iniziale, si è riscontrata una notevole difficoltà nell'eliminare l'*A. tumefaciens* dagli espianti, evidenziando la necessità di ottimizzare il protocollo di trasformazione. Questo risultato ha messo in luce l'insufficienza del protocollo utilizzato, specialmente nelle fasi critiche iniziali, e non ha permesso il rilevamento dati sulle percentuali di callogenesi, necrosi e la presenza di eventuali germogli.

Le problematiche riscontrate hanno indicato la necessità di apportare significative modifiche al protocollo per le prove successive, in particolare per quanto riguarda la scelta dell'Optical Density (OD) dell'agente di trasformazione, il lavaggio dei tessuti post infezione, e la concentrazione degli antibiotici nei terreni di selezione (LRSM). La difficoltà nel contenere l'Agrobatterio post infezione possono essere dovute ad altri differenti motivi, oltre che prevalentemente dipendere dal protocollo di trasformazione (carica batterica troppo elevata, insufficiente lavaggio dei tessuti post infezione, tempo di esposizione agli antibiotici e bassa concentrazione di questi nei substrati LRSM). Questi fattori esterni possono essere legati a fenomeni di resistenza agli agenti di selezione, condizioni ambientali favorevoli ed eccessiva manipolazione degli espianti. Oltre a ciò, la difficoltà nel contenere *A. tumefaciens* post-infezione può effettivamente dipendere dal ceppo batterico utilizzato, ed è un aspetto critico da considerare nei protocolli di trasformazione genetica. Differenti ceppi di *A. tumefaciens* possiedono, ad esempio, vari livelli di virulenza, determinata in gran parte dal loro plasmide Ti (Tumor-inducing). I ceppi più virulenti, come C58 o EHA105, sono molto efficaci nel trasferimento del T-DNA alle cellule vegetali, ma questa stessa efficacia può rendere più difficile l'eliminazione del batterio dopo l'infezione. Inoltre, non tutti i ceppi di *A. tumefaciens* sono ugualmente efficaci su tutte le specie vegetali. Alcuni ceppi possono interagire meglio con i meccanismi di difesa della pianta, rendendo più difficile la loro eliminazione dopo la trasformazione. Alcuni Agrobatteri sono anche in grado di produrre polisaccaridi extracellulari e formare biofilm, che possono proteggere i batteri dalle condizioni avverse, compresi i trattamenti antibiotici. Questi fattori sono stati identificati come determinanti nella riduzione della contaminazione da *A. tumefaciens* e nel miglioramento complessivo del processo di trasformazione.

La Tabella 6 confronta i tre protocolli adottati per ridurre la contaminazione da *A. tumefaciens* su espianti trasformati con i costrutti Inteina, CP20 e Bc DCL1/2, nel corso di sei settimane.

Il Protocollo 1 (dicembre 2023) mostra elevati livelli di contaminazione già dopo due settimane, con valori compresi tra il 59% e il 75%, che aumentano progressivamente fino a raggiungere il 100% per tutti i costrutti alla sesta settimana. Questo evidenzia una gestione inefficace della contaminazione, compromettendo il successo della selezione.

Con l'adozione del Protocollo 2 (marzo 2024), si osserva una riduzione significativa della contaminazione, con livelli che variano dal 4% al 13% dopo due settimane e una crescita moderata fino alla sesta settimana, dove i valori si attestano tra il 23% e il 31%. Questo miglioramento è attribuibile a modifiche specifiche nel protocollo,

presumibilmente riguardanti trattamenti antimicrobici e condizioni di sterilizzazione, che hanno contribuito a un migliore controllo della proliferazione batterica.

Nel Protocollo 3 (maggio 2024), è stata sperimentata una modifica sostanziale nella co-coltura batterio-tessuto, riducendola da due giorni a zero, trasferendo gli espianti direttamente su terreno LRSM. Nonostante le aspettative, i risultati sono stati meno favorevoli rispetto al Protocollo 2, con livelli di contaminazione dopo due settimane tra il 63% e il 72%, e un aumento fino al 100% per tutti i costrutti alla sesta settimana. Questo suggerisce che la riduzione del tempo di co-coltura non ha avuto un impatto positivo e ha probabilmente accelerato la crescita di *A. tumefaciens*.

In sintesi, il Protocollo 2 ha dimostrato di essere il più efficace nel contenere la contaminazione batterica e garantire condizioni ottimali per la selezione degli espianti. L'esperimento condotto nel Protocollo 3 evidenzia l'importanza critica di mantenere un adeguato periodo di co-coltura per un efficace controllo della contaminazione. L'ottimizzazione di questi protocolli è cruciale non solo per il controllo della contaminazione, ma anche per garantire il successo delle fasi successive di rigenerazione e selezione.

Tabella 6: Confronto della contaminazione da *A. tumefaciens* su espianti trasformati con i costrutti Inteina, CP20 e Bc DCL1/2, dopo l'applicazione di tre protocolli differenti (dicembre 2023, marzo 2024, maggio 2024) nel corso di sei settimane

Tempo	% di Contaminazione da <i>A. tumefaciens</i> su tessuti dopo cocoltura								
	Protocollo 1 (dicembre 2023) per i tre costrutti			Protocollo 2 (marzo 2024) per i tre costrutti			Protocollo 3 (maggio 2024) per i tre costrutti		
	Inteina	CP20	Bc DCL1/2	Inteina	CP20	Bc DCL1/2	Inteina	CP20	Bc DCL1/2
2 weeks	63%	59%	75%	6%	4%	13%	72%	68%	63%
4 weeks	97%	91%	86%	10%	9%	18%	86%	94%	92%
6 weeks	100%	100%	100%	23%	27%	31%	100%	100%	100%

Dinamiche di callogenesi e necrosi

La callogenesi è il processo mediante il quale le cellule vegetali si dedifferenziano e proliferano formando un callo, una massa di cellule indifferenziate. In questo lavoro di tesi, questo processo è stato stimolato da fitormoni come auxine (IAA) e citochinine (BAP), utilizzati in coltura in vitro per rigenerare nuovi germogli. La callogenesi post-infezione da *A. tumefaciens* non è costante perché il processo dipende dall'equilibrio ormonale indotto dal T-DNA trasferito alla pianta, che spesso porta a una produzione eccessiva di auxine e citochinine. Questo squilibrio ormonale causa una proliferazione cellulare disorganizzata, risultando in calli che possono

degenerare (Figura 20) piuttosto che differenziarsi in germogli (Figura 25). Per degenerazione dei calli si intende un deterioramento o una perdita di vitalità e organizzazione delle cellule all'interno del callo, che può manifestarsi come ingiallimento, necrosi, o arresto della crescita. In particolare, nella Figura 20, è possibile osservare come dall'inizio della proliferazione cellulare (Figura 20 A), si passi a una proliferazione incontrollata che non porta a differenziazione, in cui il callo rimane di colore biancastro (Figura 20 B e C); questa proliferazione che non si è tradotta mai in organogenesi, soprattutto per il costrutto CP20, si conclude con un callo di grandi dimensioni ma di colore nero, il che indica una necrosi cellulare (Figura 20 D). Fattori come il genotipo della pianta, la virulenza del ceppo batterico e le condizioni ambientali influenzano ulteriormente la capacità dei calli di svilupparsi in strutture organizzate. Oltre alla degenerazione, i calli formati possono subire la morte cellulare programmata (apoptosi) o necrosi, portando alla perdita totale del tessuto, o in alcuni casi rimanere in uno stato indifferenziato, continuando a proliferare senza sviluppare strutture organizzate, soprattutto se l'equilibrio ormonale non favorisce la differenziazione. Questi fattori possono essere dovuti al costrutto genico, in quanto se il gene inserito ha un'attività tossica, sovraesprime una proteina dannosa, o altera criticamente le vie metaboliche della cellula, può causare degenerazione e morte cellulare programmata (apoptosi). Inoltre, le sequenze espresse dal costrutto genico possono causare interferenze indesiderate, come effetti fitotossici, silenziamento genico o stress cellulare, portando a necrosi nei calli. Anche il ceppo di *A. tumefaciens* utilizzato nella trasformazione genetica è cruciale. Alcuni ceppi possono indurre risposte di difesa nelle piante, portando a stress ossidativo e morte cellulare. Inoltre, ceppi particolarmente virulenti possono causare infezioni o necrosi se non vengono gestiti correttamente. Il background genetico del ceppo può influenzare la stabilità del trasferimento genico e, in casi estremi, può contribuire alla degenerazione cellulare dei calli. Altri componenti che possono influenzare le dinamiche di callogenesi sono la pressione selettiva degli antibiotici, le condizioni di coltura in vitro (stress nutrizionali e combinazioni ormonali non ottimali), l'accumulo di metaboliti tossici (come ad esempio composti fenolici), modifiche epigenetiche, lo stato fisiologico delle cellule di partenza e la competizione tra cellule trasformate e non trasformate (Singh *et al.*, 2016) (Cordeiro *et al.*, 2023) (Kagami *et al.*, 2016).

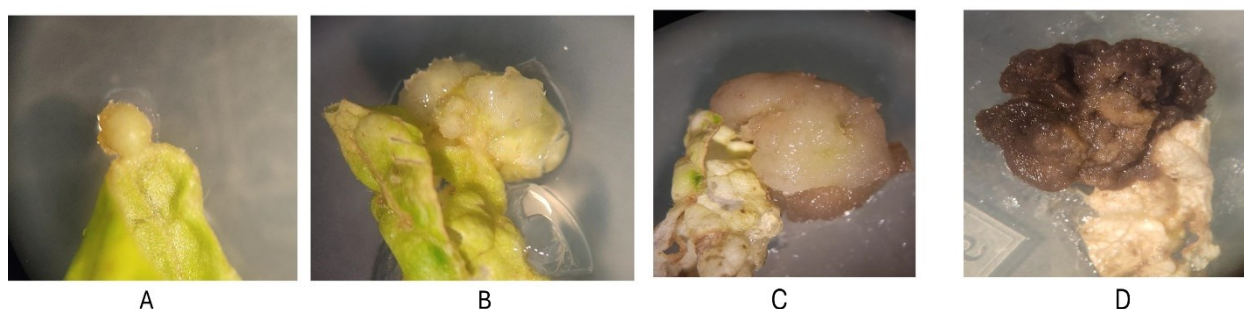


Figura 20: Dinamica di evoluzione degenerativa di un callo meristemático derivante da espianto fogliare trattato con CP20, su terreno LRSM in diversi periodi di tempo dopo l'infezione: A) 1 mese; B) 2 mesi; C) 3 mesi; D) 4 mesi (necrotico)

La percentuale di formazione dei calli è risultata piuttosto elevata nelle prove di trasformazione con il Procollo 2 (Tabella 6), con oltre il 50% della totalità degli espianti che, entro 35 giorni, mostrava un evidente sviluppo di calli di dimensioni variabili. Le osservazioni condotte su un periodo di dodici settimane hanno evidenziato che i calli ottenuti dagli espianti trattati con il costrutto *Inteina*, sebbene solo uno sia riuscito a rigenerare un germoglio, si sono rivelati i più stabili. Questi calli hanno manifestato fenomeni di necrosi, crescita rallentata e riduzione della proliferazione cellulare, ma non sono mai andati incontro ad alterazioni morfologiche significative che avrebbero potuto compromettere ulteriormente la rigenerazione.

Al contrario, i calli derivati dagli espianti dopo la co-coltura con i ceppi di *Agrobacterium* contenenti i costrutti Bc DCL1/2 e specialmente CP20, hanno mostrato una maggiore tendenza alla degenerazione, caratterizzata da fenomeni come la formazione di ammassi cellulari indifferenziati (Figura 20). Questi processi degenerativi hanno ostacolato la differenziazione cellulare necessaria per la rigenerazione dei germogli, portando infine alla necrosi o alla stasi del callo, che non ha potuto evolversi ulteriormente. Il destino dei calli, in assenza di rigenerazione, è stato quindi quello di rimanere in uno stato di crescita indeterminata o di subire una degenerazione completa, culminando nella perdita della vitalità cellulare. Per migliorare i risultati rigenerativi, sarebbe utile ottimizzare le condizioni di coltura, in particolare modulando le concentrazioni di fitoregolatori per promuovere un equilibrio ormonale più favorevole alla differenziazione cellulare e alla rigenerazione, oltre che ad uno studio approfondito delle interazioni pianta-ceppo di *Agrobacterio* e pianta-costrutto, in particolare per quanto riguarda il possibile effetto del peptide espresso dal CP20 sul metabolismo cellulare.

La necrosi dei tessuti post-infezione nel terreno di rigenerazione e selezione contenente kanamicina (LRSM), nel contesto della trasformazione genetica, è un segnale atteso e desiderato che conferma che il sistema di selezione sta funzionando correttamente. Si parla infatti di selezione positiva, cioè i tessuti che non necrotizzano sono probabilmente quelli trasformati, contenenti il gene *nptII*, e dovrebbero essere quelli su cui focalizzare ulteriori analisi e rigenerazione. Tuttavia, è fondamentale monitorare il processo per assicurarsi che la necrosi non sia eccessiva e che i tessuti trasformati abbiano buone possibilità di rigenerarsi. La necrosi dei tessuti, in questo contesto, è un'indicazione che il sistema di selezione sta funzionando correttamente: solo le cellule trasformate sopravvivono.

Le dinamiche necrotiche all'interno delle microbox sono state comunque attentamente monitorate, in quanto se si osserva una necrosi diffusa che coinvolge la maggior parte dei tessuti, inclusi quelli che ci si aspetta siano trasformati, potrebbe indicare un problema con la concentrazione degli antibiotici (sovraesposizione) o con il protocollo di trasformazione.

I tessuti che non necrotizzano in presenza di kanamicina sono molto probabilmente trasformati, ma non è garantito al 100%. Alcuni tessuti vegetali possono infatti sopravvivere alla kanamicina anche senza aver integrato il gene *nptII*. Questo fenomeno è noto come "escape", dove alcune cellule possono essere tolleranti all'antibiotico senza essere realmente trasformate. Può inoltre accadere che solo una parte del tessuto sia

effettivamente trasformata, creando un mosaico di cellule trasformate e non trasformate, ma tutte possono apparire vitali (mosaicismo/chimerismo). Un altro caso può riguardare la concentrazione dell'agente selettivo (kanamicina), che se troppo bassa potrebbe non essere sufficientemente efficace nel selezionare solo i tessuti trasformati, permettendo la sopravvivenza anche di tessuti non trasformati.

Nell'analisi dati sintetizzata nei grafici delle Figure 21, 22 e 23 è possibile osservare le dinamiche di callogenesi e necrosi in relazione ai diversi costrutti genici utilizzati per la trasformazione.

Nella Figura 21 è mostrato il grafico di dinamica di callogenesi e necrosi dei tessuti dopo la cocoltura con agro caricato con il costrutto per l'espressione stabile in pianta dell'Inteina. La callogenesi mostra un aumento progressivo, partendo da circa il 20% alla seconda settimana e raggiungendo circa il 50% alla dodicesima settimana. Questo andamento riflette un costante, ma moderato, sviluppo di tessuti, suggerendo che il costrutto per l'espressione dell'Inteina non influisce negativamente sulla rigenerazione cellulare. Per quanto riguarda la necrosi, questa inizia a valori relativamente bassi intorno al 10-15% alla seconda settimana, ma aumenta gradualmente con il tempo fino a raggiungere il 50% alla dodicesima settimana. La necrosi in questo contesto è attribuibile alla selezione antibiotica con kanamicina, che evidenzia la presenza di espianti non vitali, e non riflette un impatto diretto della possibile espressione dell'Inteina, ma maggiormente legato all'efficienza di trasformazione del protocollo applicato.

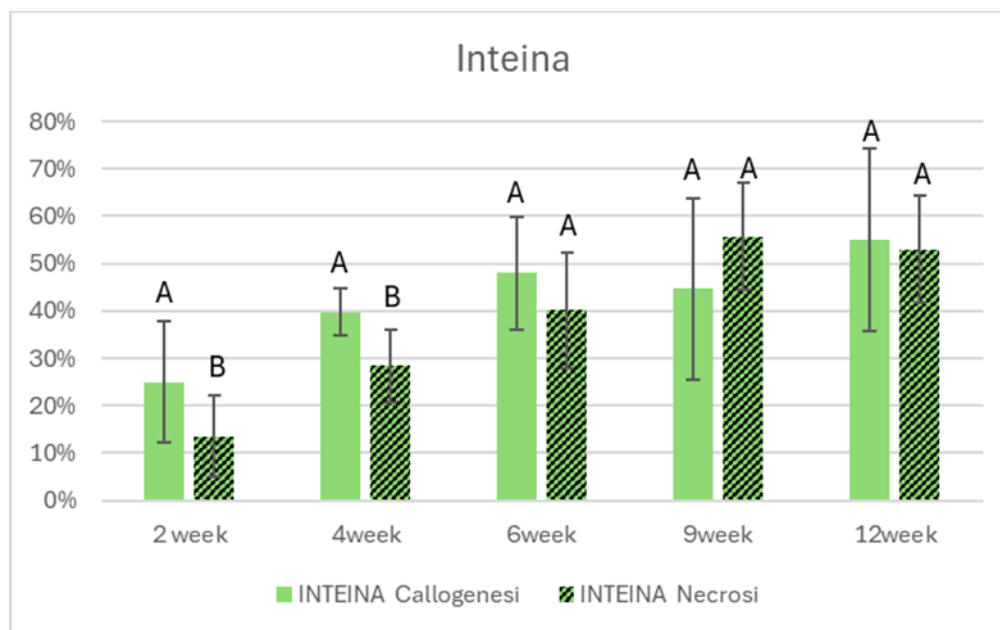


Figura 21: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto Inteina

Per quanto riguarda i tessuti derivati dalla cocoltura con il costrutto CP20 (Figura 22), si nota che la callogenesi segue un andamento peculiare. Parte da circa il 20% alla seconda settimana, ma, a differenza dei costrutti per l'espressione di Inteina e Bc DCL1/2, non cresce in modo progressivo. Dopo un picco alla sesta settimana, intorno al 40%, si osserva una significativa riduzione nella fase successiva (9 settimane), dove la callogenesi

scende fino a circa il 20%, stabilizzandosi le settimane successive. La necrosi, invece, segue un andamento più regolare: inizia a livelli molto bassi, ma dopo la sesta settimana cresce significativamente, raggiungendo quasi il 70% entro la dodicesima settimana e mantenendosi su questi livelli fino alla quindicesima. Anche qui, la necrosi è il risultato della pressione selettiva della kanamicina. L'analisi Anova one-way e il test di Tukey HSD confermano che ci sono differenze significative tra callogenesi e necrosi anche oltre la sesta settimana dopo l'infezione con Agrobatterio e i due giorni di co coltura, al contrario degli altri due costrutti esperimenti Inteina e Bc DCL1/2. Questo evidenzia il fatto che la possibile espressione in pianta della CP20 ha contribuito a far crescere esponenzialmente la necrosi, come per gli altri costrutti, mentre ha promosso una degenerazione dei calli pre formati e una maggiore difficoltà nel produrre nuovi tessuti cellulari indifferenziati.

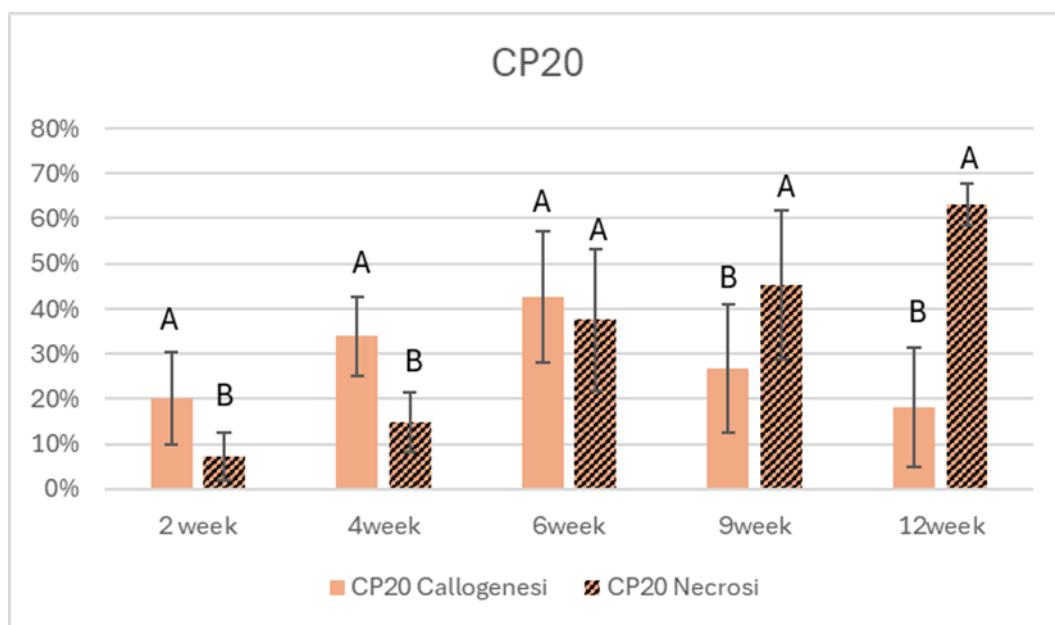


Figura 22: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto CP20

Gli espianti derivati dalla cocoltura con il costrutto Bc DCL1/2 (Figura 23) mostrano un andamento crescente e continuo per la callogenesi, che raggiunge il 20% alla seconda settimana e circa il 40% alla dodicesima settimana, evidenziando un'efficacia graduale e stabile del costrutto RNAi nel promuovere la formazione di tessuto. La necrosi, invece, mostra un andamento simile agli altri costrutti, con un'iniziale bassa incidenza (circa 10-15%) e un incremento significativo dopo la sesta settimana, culminando intorno al 50% alla fine della dodicesima settimana. Confrontando i risultati dai costrutti Bc DCL1/2 con il CP20, risulta evidente che l'effetto della sua espressione sulla callogenesi è risultato meno impattante e più lineare rispetto all'AMPs. L'Inteina presenta un andamento simile, ma con livelli di callogenesi leggermente superiori. Il CP20, invece, mostra un comportamento molto diverso, portando ad una callogenesi discontinua e una riduzione nelle fasi intermedie, segno che l'espressione del peptide prodotto dal costrutto CP20 potrebbe interferire con il metabolismo cellulare

così da bloccare i processi di divisione e differenziamento cellulare ottenuti sui substrati utilizzati. Il costrutto Bc DCL1/2, invece, induce una minor influenza negativa sul processo di callogenesi nel tempo.

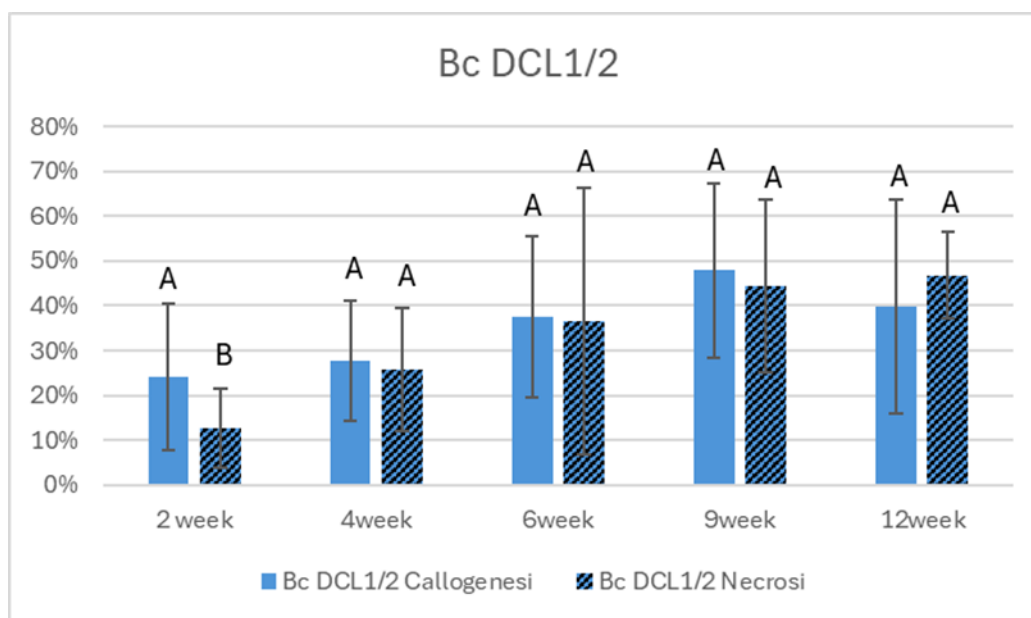


Figura 23: Dinamiche di callogenesi e necrosi degli espianti fogliari trattati con il costrutto a RNAi Bc DCL1/2

Gli espianti trattati con i costrutti Inteina (controllo plasmidico del CP20) e CP20 (peptide antimicrobico AMPs) mostrano un'importante diversa risposta di rigenerazione dei tessuti (Figura 24). Pur essendo la necrosi comparabile tra i due trattamenti, è la differenza nella callogenesi che rivela l'impatto maggiore della possibile espressione CP20 rispetto all'Inteina.

Il grafico della callogenesi mostra chiaramente che l'espressione dell'Inteina porta ad un processo rigenerativo più stabile e duraturo. Nelle prime settimane, gli espianti infettati con entrambi i costrutti mostrano livelli comparabili di callogenesi, con una lieve superiorità di Inteina già a partire dalla seconda settimana. Questa osservazione è supportata anche dall'analisi statistica con Anova e Tukey test, che conferma che non vi sono differenze significative tra i due trattamenti fino alla sesta settimana. Tuttavia, col passare del tempo, l'efficacia della rigenerazione degli espianti trasformati con Inteina continua a migliorare, raggiungendo picchi superiori al 50% alla sesta settimana, e mantenendo tale tendenza fino alla fine del periodo di osservazione. Al contrario, gli espianti derivati dalla cocoltura con il costrutto CP20 mostrano una callogenesi più limitata e che tende a diminuire più rapidamente rispetto al controllo plasmidico Inteina, soprattutto dopo la sesta settimana, come confermato anche dall'analisi statistica. Sebbene gli espianti infettati con il costrutto esprimente il CP20 mostrino inizialmente la formazione del callo, nel lungo periodo la callogenesi viene influenzata

negativamente, portando necrotizzazione. La progressiva riduzione del tasso di callogenesi suggerisce che la possibile espressione del CP20 induca nel tempo una degenerazione e perdita di vitalità calli.

Tuttavia, la necrosi degli espianti risulta essere relativamente comparabile tra espiante derivati da cocoltura con costrutti Inteina e CP20. Questo fenomeno è legato principalmente all'effetto della selezione antibiotica, piuttosto che alla qualità della rigenerazione dei calli. Gli espianti infettati con entrambi i costrutti mostrano un progressivo aumento della necrosi con l'avanzare delle settimane, ma senza differenze significative tra i due costrutti. Questo conferma che l'influenza della possibile espressione CP20 sulla necrosi è equiparabile a quella dell'Inteina e non rappresenta un fattore discriminante per valutare l'efficienza di trasformazione.

La differenza cruciale risiede nell'influenza negativa sull'efficienza di callogenesi che sembra indurre l'espressione del CP20 negli espianti infettati rispetto all'Inteina. Il CP20, essendo un peptide antimicrobico, potrebbe interferire con i processi cellulari necessari per una rigenerazione stabile, anche se non induce un aumento significativo della necrosi tissutale. Questo peptide antimicrobico può influire negativamente sui meccanismi di proliferazione cellulare, compromettendo la stabilità e la vitalità dei calli. Il fatto che i calli formati tendano a degenerare più rapidamente rispetto al costrutto controllo con Inteina suggerisce che il CP20 potrebbe interferire con i metabolismi essenziali per la vitalità cellulare e per i processi di morfogenesi. Questo fenomeno potrebbe essere dovuto a fattori molecolari e cellulari legati alla natura del peptide antimicrobico CP20. Gli AMPs possiedono, per definizione, attività antimicrobica, e tale proprietà potrebbe interferire con i processi cellulari normali, compromettendo la proliferazione cellulare e la differenziazione necessaria per la formazione di calli stabili. La continua presenza del peptide potrebbe innescare risposte di stress negli espianti, aumentando la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e attivando processi di apoptosi o necrosi, agire sulla pompa protonica, inibire la proliferazione dei protoplasti o interferire con le vie di segnalazione che regolano la formazione del callo, rendendolo suscettibile alla degenerazione. In uno studio condotto da Ávalos-Rangel et al. (2024), pubblicato su *Journal of Plant Growth Regulation*, è stato analizzato l'effetto del peptide CLE14 sulla rigenerazione del callo e delle radici in *Arabidopsis*. I risultati indicano che l'espressione dell'AMPs comporta una significativa inibizione della rigenerazione del callo e della crescita delle radici, come avvenuto per il CP20 in questo lavoro di tesi. Questo suggerisce che il peptide ha un impatto negativo sui processi cellulari fondamentali per la rigenerazione. In particolare, il CLE14 sembra interferire con i meccanismi di segnalazione ormonale che regolano la proliferazione cellulare e la formazione dei tessuti.

In sintesi, mentre la necrosi rimane pressoché invariata tra i due costrutti, perchè principalmente legata all'efficienza dell'agente di selezione usato nel protocollo applicato, è evidente che la callogenesi viene significativamente influenzata dall'espressione del costrutto CP20. Esso sembra indurre una formazione di calli instabili e soggetti a degenerazione nel lungo periodo.

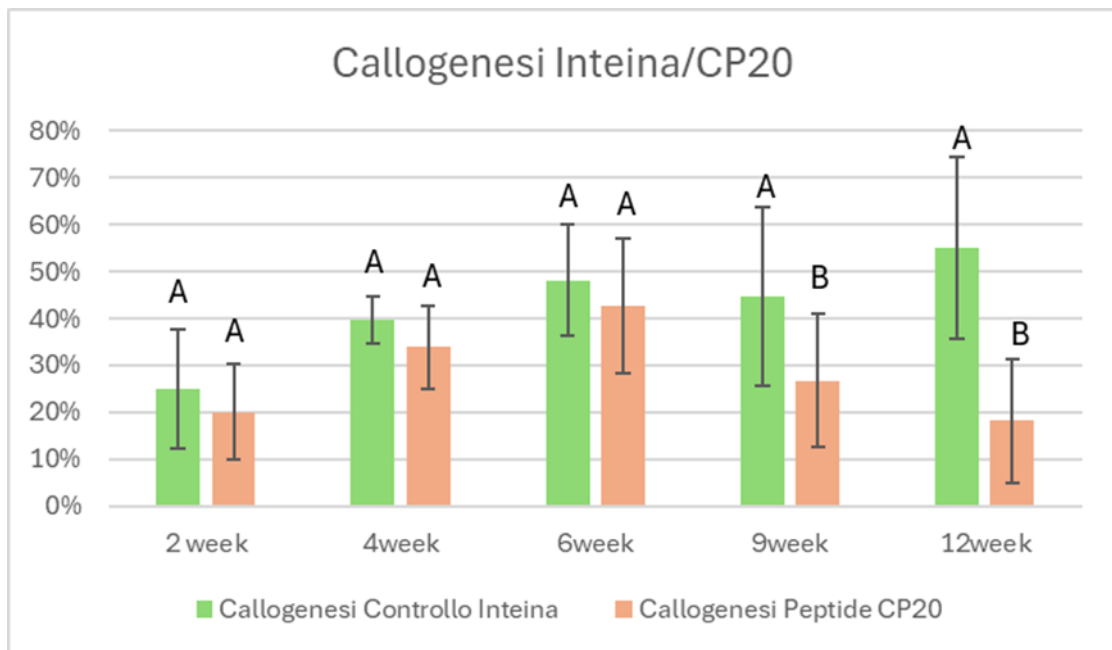


Figura 24: Confronto percentuale di callogenesi tra Inteina e CP20

4.4 Prove di rigenerazione

La mancata rigenerazione (organogenesi) dei calli successivamente all'infezione da *A. tumefaciens* può essere attribuita a diversi fattori, tra cui il costrutto genico utilizzato e il ceppo batterico impiegato. Questi elementi influenzano profondamente l'efficienza di trasformazione genetica e la capacità dei tessuti vegetali di rigenerare strutture organizzate come germogli e radici.

L'inserimento di geni che influenzano la sintesi o la regolazione dei fitormoni può causare uno squilibrio ormonale nel tessuto vegetale trasformato, ostacolando la differenziazione cellulare necessaria per l'organogenesi (Klee *et al.*, 1987). Ad esempio, un'eccessiva produzione di auxine o citochinine può portare a una proliferazione cellulare disorganizzata e alla successiva degenerazione del callo. Inoltre, sempre in relazione al costrutto utilizzato, si possono avere l'effetto posizione e la mutagenesi inserzionale: l'integrazione casuale del T-DNA nel genoma vegetale può interrompere geni endogeni essenziali per la crescita e lo sviluppo, causando anomalie morfologiche e impedendo la formazione di germogli (Gelvin, 2003). Infine, l'effetto posizione può influenzare l'espressione del transgene, portando a livelli inappropriati di proteine che interferiscono con i processi di rigenerazione (Zambryski *et al.*, 1989). Promotori forti e costitutivi, come il 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV 35S), possono causare un'espressione eccessiva dei geni inseriti, disturbando i normali processi fisiologici della pianta e ostacolando l'organogenesi.

I diversi ceppi di *A. tumefaciens* presentano variazioni nei geni di virulenza che determinano la capacità di trasferire efficacemente il T-DNA alle cellule vegetali. Ceppi con bassa efficienza possono portare a

trasformazioni incomplete o instabili, compromettendo l'organogenesi (Liu & Nester, 2006). Inoltre, la compatibilità tra il ceppo batterico e la specie vegetale è fondamentale: ceppi non compatibili possono provocare risposte di difesa eccessive nella pianta, inclusa la produzione di specie reattive dell'ossigeno che danneggiano il tessuto e impediscono l'organogenesi (Pitzschke, 2013). Alcuni ceppi possono anche persistere nel tessuto vegetale anche dopo trattamenti di eliminazione, causando fitotossicità e degradazione dei calli, impedendo difatti la rigenerazione (Opabode, 2006).

Nel corso dell'esperimento di rigenerazione, è stato ottenuto un singolo germoglio rigenerato per organogenesi da un callo sviluppato da espianto fogliare trattato con il costrutto *Inteina* tramite *A. tumefaciens* (Figura 25). Questo risultato evidenzia l'efficienza limitata del protocollo di trasformazione e rigenerazione in questo contesto specifico, verosimilmente influenzato dalla complessità dei costrutti genici e dalle condizioni di coltura adottate. Gli espianti trattati con i costrutti *Inteina*, CP20 e Bc DCL1/2 hanno prodotto vari tipi di callo, inclusi molti calli di colore verde. I calli verdi risultano particolarmente rilevanti rispetto ai calli bianchi o neri, in quanto la loro colorazione verde è indicativa della presenza di cloroplasti attivi e della capacità di svolgere la fotosintesi, suggerendo una maggiore vitalità cellulare e un potenziale rigenerativo superiore. I calli verdi sono associati a una capacità differenziativa più elevata, con maggiore propensione a sviluppare tessuti specifici come foglie e germogli, rispetto ai calli bianchi, che generalmente contengono cellule meno differenziate, o ai calli neri, che spesso indicano necrosi cellulare e compromissione della vitalità. Tuttavia, nonostante la formazione di calli verdi, nessuno degli espianti trattati con i costrutti CP20 hanno rigenerato nuovi germogli. Gli espianti trattati con il costrutto Bc DCL1/2 invece hanno mostrato diverse iniziali di rigenerazione ed almeno una di questa ha rigenerato germogli, purtroppo persi nelle prime prove di trasformazione per problemi di contaminazione. Questo risultato ha sottolineato la necessità di ulteriori ottimizzazioni nel protocollo di trasformazione e rigenerazione per migliorare l'efficienza del processo e il successo della rigenerazione completa, in relazione anche ai costrutti genici e ceppi di *A. tumefaciens* utilizzati.

Il germoglio rigenerato ha inizialmente proliferato e si è allungato su terreno MS integrato con 1 mg/L di BAP e 0,1 mg/L di IAA, consentendo la proliferazione e lo sviluppo di un totale di sette germogli secondari, successivamente separati dal callo originario (Figura 18 C). Questa combinazione di regolatori di crescita ha stimolato sia la moltiplicazione dei germogli che la loro iniziale crescita morfologica. La diminuzione graduale di BAP (rispetto al terreno LRSM) è stata necessaria per evitare un'eccessiva proliferazione e favorire uno sviluppo più lineare e morfologicamente equilibrato, riducendo al contempo l'effetto inibitorio sulla futura fase di radicazione.

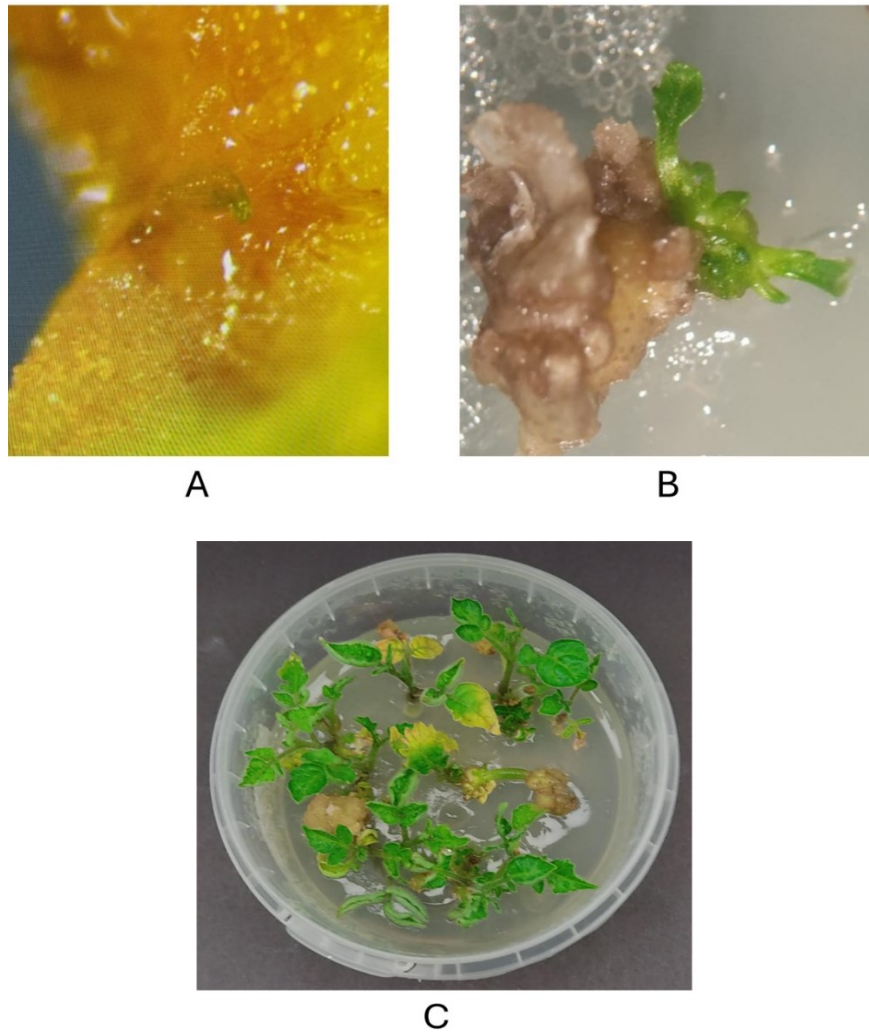


Figura 25: Organogenesi di un callo meristemico derivante da espianto fogliare infettato con il costrutto *Inteina*: inizio della differenziazione (A); la formazione delle prime strutture del germoglio rigenerato (B); proliferazione del germoglio rigenerato (C)

4.5 Risultati della trasformazione mediante analisi molecolare PCR ed elettroforesi

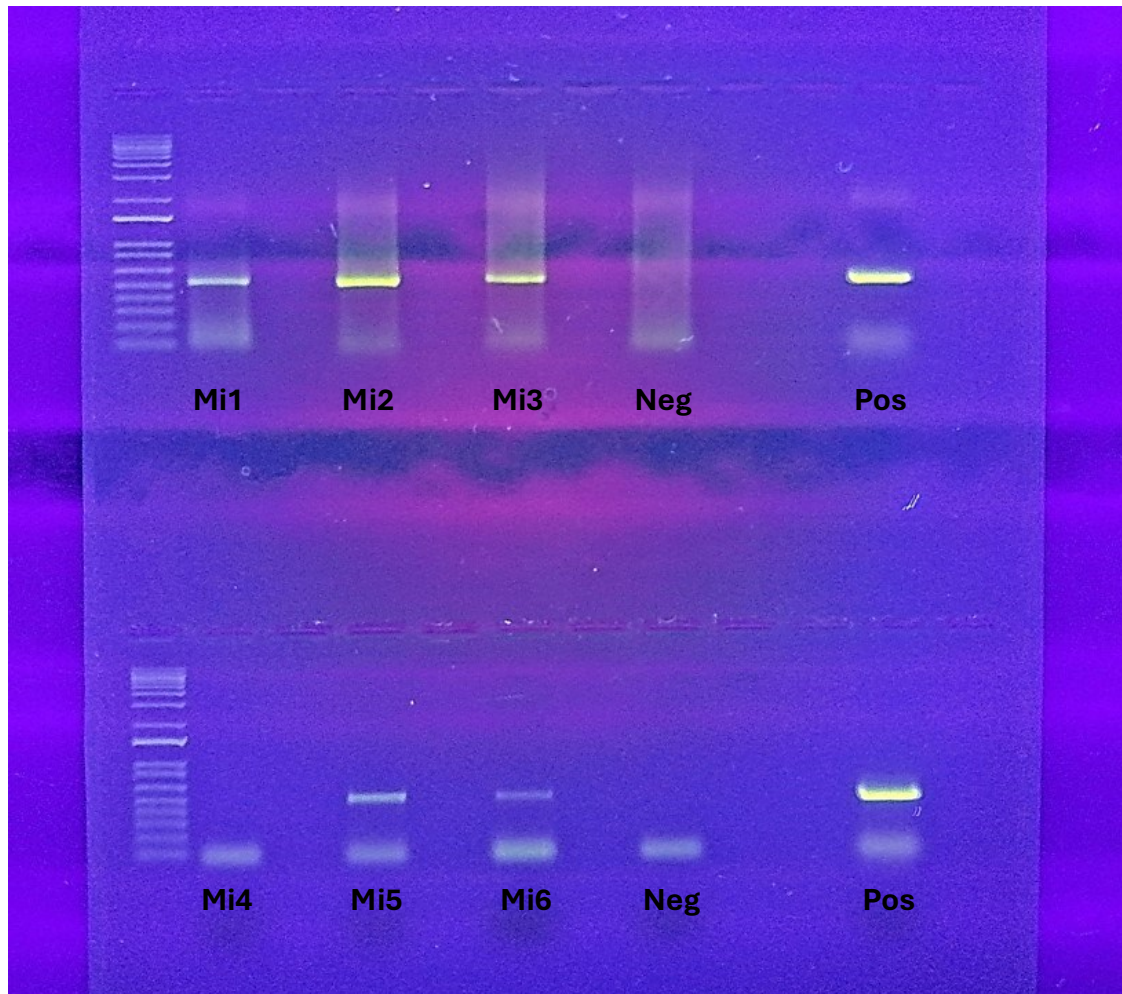
L'analisi molecolare condotta tramite elettroforesi su gel di agarosio ha permesso di verificare l'esito dell'amplificazione del gene *nptII* (neomicina fosfotransferasi II) mediante reazione a catena della polimerasi (PCR). Questo gene è stato utilizzato come marcatore di selezione per dimostrare l'integrazione dell'evento trasformativo in un germoglio ottenuto per via organogenetica da un callo, derivato da un espianto fogliare sottoposto a trasformazione genetica mediante *A. tumefaciens*. L'Agrobatterio, veicolando un costrutto genetico contenente la sequenza dell'*Inteina*, ha facilitato la trasformazione. L'*Inteina* è stata utilizzata come elemento di controllo plasmidico (del CP20), vista la sua capacità di intervenire nell'autosplicing proteico, consentendo il rilascio di proteine funzionali post-traduzionali, e la sua presenza costituisce un indicatore utile per monitorare il successo della trasformazione.

Nel dettaglio, l'elettroforesi ha evidenziato una chiara separazione delle bande relative ai prodotti di PCR ottenuti (Figura 26). La prima riga del gel mostra i risultati della prima PCR eseguita, mentre la seconda riga rappresenta i risultati della seconda reazione PCR, confermando l'amplificazione del gene *nptII* in entrambi i casi. La presenza di bande nette e ben definite indica un'efficace amplificazione del target genetico. L'utilizzo del marker di peso molecolare, visibile nella corsia di sinistra, ha consentito di stimare con precisione la dimensione degli ampliconi, che corrispondono alla lunghezza attesa del gene *nptII* (540 pb), confermando la specificità delle reazioni PCR.

L'*nptII* è noto per conferire resistenza alla kanamicina, e la sua integrazione è un indicatore chiave dell'avvenuta trasformazione genetica. Nei campioni di controllo negativi, si osserva l'assenza di bande corrispondenti al gene trasformato, rafforzando ulteriormente la validità dei risultati osservati. La separazione delle bande all'interno del gel riflette un efficiente processo di amplificazione, e l'assenza di bande aspecifiche o "smearing" (strisciature) suggerisce un'elevata purezza dei prodotti di PCR.

L'integrazione di *nptII* e del costrutto contenente l'Inteina è stata quindi dimostrata con successo in questo esperimento. La corretta organizzazione delle bande nel gel è coerente con l'ipotesi di un'integrazione stabile e funzionale del costrutto nel genoma della pianta ospite. Questi risultati confermano il successo della trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens*, fornendo un'importante evidenza della funzionalità del sistema di trasformazione adottato e dell'espressione stabile del gene di interesse nel tessuto vegetale trasformato.

Il primo risultato ottenuto dalla trasformazione in pomodoro, verificato tramite l'analisi PCR e documentato fotograficamente, rappresenta un traguardo significativo. Si tratta di una prima conferma che il costrutto, contenente il dsRNA di pi-NESTO, è stato correttamente integrato nel portainnesto di pomodoro ospite. Questo risultato è di particolare rilevanza scientifica poiché permette di avviare sperimentazioni mirate a verificare la mobilità sistemica del dsRNA tra i tessuti del portainnesto e il nesto, un passaggio cruciale per valutare l'efficacia del meccanismo di silenziamento genico esogeno. Prima sarà possibile verificare il passaggio del dsRNA prodotto dal costrutto Inteina tra portainnesto e nesto, confermando così la traslocazione all'interno del floema della pianta innestata. Solo dopo questa fase si potrà procedere con nuove trasformazioni utilizzando costrutti che includano geni di resistenza, come il CP20 e il Bc DCL1/2, al fine di valutare l'efficacia del meccanismo di silenziamento genico nell'indurre resistenza contro specifici patogeni nelle piante di pomodoro. Questo approccio graduale potrebbe garantire una solida base sperimentale per ottimizzare la protezione delle piante tramite la tecnologia del dsRNA associata ai vantaggi fisiologici derivanti dall'innesto.



*Figura 26: Elettroforesi su gel di agarosio al 1% dei prodotti PCR per la verifica dell'integrazione del costrutto genico *Inteina* portante il gene *nptII* in germogli ottenuti tramite organogenesi da callo di espianto fogliare trasformato con *A. tumefaciens*. La prima riga si riferisce alla PCR con *Phire Tag*, la seconda riga a quella con *Green master mix*: Marcatore di peso molecolare o "ladder": 1 kb; M1 e M3) Diluizione seriale del campione a 1/2; M2 e M4) Diluizione seriale del campione 1/10 ; M3 e M5) Diluizione seriale del campione 1/30; Neg) Campione negativo *Phire Tag* e *Green Master Mix*: il controllo negativo non contiene DNA bersaglio ma solamente i reagenti; Pos: il controllo positivo è un campione che contiene il frammento di DNA bersaglio amplificato dalla PCR (*nptII* - 540 pb)*

CAPITOLO 5

CONCLUSIONI

Micropropagazione

Le analisi condotte durante le fasi di sterilizzazione dei semi del portinnesto di pomodoro Beaufort hanno dimostrato l'elevata efficienza del protocollo adottato. L'assenza di contaminazione per il 91% del materiale trattato evidenzia la validità del metodo nel prevenire infezioni, anche considerando il trasferimento da Petri a vaso, fase critica in cui si è osservata una lieve insorgenza di contaminazioni fungine (9%). Questo risultato conferma l'importanza di un protocollo di sterilizzazione rigoroso per garantire la sanità e la qualità del materiale vegetale in vitro, fondamentale per la proliferazione su larga scala. Un'efficiente sterilizzazione iniziale, sia su semi che su materiale vegetale di partenza, è cruciale in micropropagazione per ridurre il rischio di contaminazioni, che potrebbero compromettere l'intero ciclo di moltiplicazione in vitro. Inoltre, un tasso di sterilizzazione elevato permette di utilizzare la quasi totalità del materiale vegetale generato per successive fasi di propagazione, migliorando la produttività e la qualità complessiva del processo. In questo contesto, il protocollo di sterilizzazione testato si è rivelato altamente efficace, fornendo una solida base per la produzione continua di materiale vegetale sano e pronto per le fasi successive di crescita e moltiplicazione, oltre che fornire il materiale base per la trasformazione e la rigenerazione.

Il monitoraggio della germinazione dei semi del portinnesto Beaufort in condizioni controllate ha evidenziato l'efficienza e la rapidità del processo. Le condizioni standardizzate (fotoperiodo, temperatura, illuminazione, substrato di coltura MS0) hanno favorito un'elevata percentuale di germinazione, con un andamento significativo già nei primi giorni. L'incremento rapido tra il secondo e il terzo giorno, culminato in una germinazione del 96% entro l'ottavo giorno, sottolinea l'alta vitalità dei semi e la robustezza del protocollo utilizzato. Il raggiungimento di una percentuale così elevata in tempi relativamente brevi dimostra l'efficacia del sistema di germinazione in ambiente chiuso e sterile, che ha permesso di evitare interferenze esterne come contaminazioni o stress ambientali. La capacità di germinazione rapida e vigorosa ha permesso di ottenere plantule sane e pronte per il successivo trasferimento in substrato solido (MS0) per il proseguimento della crescita. L'importanza di un'efficace germinazione risiede nel garantire materiale vegetale uniforme e robusto per le fasi successive di propagazione. Questo rappresenta un passaggio fondamentale per l'ottenimento di piante madri vigorose, utilizzate successivamente per la proliferazione degli espianti delle gemme apicali e ascellari. L'elevata germinabilità osservata ha quindi un impatto diretto sull'intero processo di micropropagazione, riducendo i tempi e garantendo una base solida per la produzione in vitro su larga scala.

La micropropagazione del portinnesto di pomodoro Beaufort rappresenta una tecnica innovativa e strategica per un'azienda agricola che mira a massimizzare la qualità e l'efficienza nella produzione di portinnesti. Questa pratica rappresenta una tecnologia promettente, ma richiede un'analisi dettagliata dei vantaggi e dei limiti per comprendere meglio il suo potenziale applicativo. I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano un tasso di successo del 97% nella proliferazione e radicazione degli espianti, con una media di 2,6 nuovi germogli per pianta per ciclo di subcoltura di due settimane.

Questa efficienza dimostra la validità della tecnica, specialmente se consideriamo che non sono stati utilizzati regolatori di crescita, evidenziando la vigoria naturale del portinnesto selvatico Beaufort. L'uso delle gemme apicali e ascellari nella micropropagazione consente di riutilizzare le parti vegetali che in una pratica tradizionale di innesto erbaceo sarebbero scartate. Questo rappresenta un vantaggio sia economico che ambientale, poiché si riduce la quantità di rifiuti vegetali e si ottiene massima efficienza nell'utilizzo del materiale genetico disponibile.

Nonostante le condizioni climatiche sfavorevoli, con temperature inferiori alla media, la prima prova di ambientamento del portinnesto di pomodoro Beaufort ha mostrato risultati promettenti, anche se con percentuali di mortalità troppo elevate in un'ottica di efficienza aziendale. Dopo 7 giorni, il 76,7% delle piantine era sopravvissuto, scendendo al 70% dopo 10 giorni. Le piante sopravvissute erano in buono stato di salute, dimostrando una buona resilienza. Questi risultati, sebbene indicativi di una necessità di ottimizzazione delle condizioni di ambientamento, confermano il potenziale positivo del processo di acclimatemento.

Un aspetto centrale per l'adozione della micropropagazione in azienda è la possibilità di ottenere un materiale genetico esente da malattie, elemento essenziale per garantire portinnesti sani e robusti, riducendo così l'incidenza di problematiche fitosanitarie nelle coltivazioni. Questo vantaggio è particolarmente rilevante quando si opera su larga scala o quando si utilizzano portinnesti con resistenza a patogeni o con caratteristiche agronomiche specifiche. Inoltre, la capacità di produrre in modo massivo materiale geneticamente uniforme contribuisce a migliorare la gestione della produzione, riducendo la variabilità e garantendo prestazioni costanti. Dal punto di vista economico, pur considerando che la micropropagazione richiede infrastrutture specializzate e personale qualificato, il bilancio costi-benefici potrebbe risultare favorevole, soprattutto in contesti in cui la qualità del materiale di partenza è centrale. Rispetto alla propagazione tradizionale da seme, la micropropagazione permette di mantenere intatte le caratteristiche genetiche del portinnesto, garantendo omogeneità e resistenza nei cloni prodotti. Questo aspetto è particolarmente rilevante per le aziende che operano nel settore del germoplasma brevettato, dove la protezione e la valorizzazione delle varietà sono fondamentali, anche per la gestione delle royalty. La micropropagazione può, infatti, facilitare il controllo della qualità e della distribuzione del materiale genetico brevettato, riducendo il rischio di propagazione illegale. Uno dei principali vantaggi della micropropagazione, come detto, è la possibilità di ottenere materiale esente da patogeni e omogeneo dal punto di vista genetico. Questa uniformità è particolarmente importante per la produzione di portinnesti di alta qualità, che devono presentare caratteristiche agronomiche costanti per supportare innesti efficaci e resistenti alle malattie. In colture come pomodoro, in cui la gestione delle fitopatie è essenziale, la

disponibilità di portinnesti sani può ridurre l'uso della lotta chimica attraverso agrofarmaci e migliorare dunque la sostenibilità ambientale.

La capacità di moltiplicare rapidamente le gemme apicali e ascellari significa che la micropropagazione può essere utilizzata per preservare e valorizzare cultivar pregiate o portinnesti resistenti, consentendo la moltiplicazione su larga scala senza perdita di qualità. Questo approccio è particolarmente utile per la conservazione del germoplasma brevettato, consentendo alle aziende di mantenere il controllo sulla distribuzione delle varietà e di gestire più efficacemente i diritti di proprietà intellettuale.

Rispetto alla propagazione da seme, che richiede più tempo e comporta una maggiore variabilità genetica, la micropropagazione permette una produzione costante e prevedibile. Questo si traduce in una gestione più efficiente delle risorse aziendali, con la possibilità di pianificare in modo preciso il numero di piante da destinare alla produzione di portinnesti e ridurre al minimo gli sprechi.

Nonostante i vantaggi, la micropropagazione non è ancora particolarmente utilizzata per il pomodoro, per il quale si preferiscono gli altri metodi di propagazione tradizionali, soprattutto a causa dei costi iniziali e della complessità tecnica necessaria per implementare questa tecnologia. Le strutture specializzate, l'uso di manodopera qualificata e il tempo necessario per gestire il processo in vitro rappresentano ostacoli che limitano la diffusione della micropropagazione rispetto a colture come fragola, piccoli frutti, melo, pero e carciofo, dove la tecnica è già consolidata. L'allestimento di un laboratorio di micropropagazione comporta costi elevati per le infrastrutture, gli strumenti e la formazione del personale. Sebbene questi costi possano essere ammortizzati con una produzione su larga scala, per aziende di dimensioni più piccole o per quelle che operano in mercati più competitivi, l'investimento iniziale può essere un deterrente rispetto alla propagazione da seme. Nonostante il successo della micropropagazione nei test sperimentali, i germogli micropropagati possono mostrare un ciclo di crescita più lento rispetto alle piantine ottenute da seme in condizioni di campo, in relazione anche alla fase di ambientamento e acclimatazione da vitro a vivo. Questo può tradursi in un ritardo nella disponibilità di portinnesti, con impatti sulla tempistica delle operazioni agricole.

Per le varietà brevettate o i portinnesti sviluppati con tecniche avanzate di breeding, la gestione delle royalty può rappresentare una sfida significativa. La micropropagazione permette un controllo più rigido sulla distribuzione del materiale vegetale, riducendo il rischio di violazioni dei diritti di proprietà intellettuale, ma richiede una strategia di gestione efficiente per massimizzare il ritorno economico senza compromettere la disponibilità del materiale per la filiera produttiva.

La micropropagazione, pur presentando un costo iniziale più elevato, offre nel lungo termine significativi vantaggi economici, specialmente per le aziende che desiderano garantire la qualità genetica e la sanità del materiale di partenza. In un contesto di produzione su larga scala, l'investimento in micropropagazione può essere ammortizzato grazie alla maggiore resa, al minor spreco di materiale e alla riduzione delle perdite dovute a malattie. Tuttavia, rispetto alla propagazione da seme, che è una pratica consolidata e meno costosa, l'adozione

su larga scala della micropropagazione richiede una giustificazione in termini di mercato di nicchia o per prodotti ad alto valore aggiunto.

In sintesi, sebbene la micropropagazione del pomodoro non sia ancora ampiamente utilizzata a livello commerciale, i risultati ottenuti suggeriscono che questa tecnica potrebbe rappresentare una soluzione ideale per aziende che puntano alla qualità “premium”, alla gestione efficiente del germoplasma e alla produzione di portinnesti resistenti e uniformi.

Trasformazione e rigenerazione

Questo lavoro di tesi ha fornito un contributo alla comprensione e miglioramento dei processi di trasformazione genetica e rigenerazione del portinnesto di pomodoro Beaufort. L'analisi approfondita e l'ottimizzazione dei protocolli di trasformazione e rigenerazione hanno permesso di ottenere risultati promettenti, sebbene con diverse difficoltà da affrontare. L'ottimizzazione del protocollo di trasformazione si è rivelata un passo cruciale in questo studio. La presenza di contaminazioni residue ha richiesto una rigorosa selezione e l'implementazione di strategie supplementari per garantire l'affidabilità dei risultati. La prova di rigenerazione ha evidenziato inoltre la necessità di una continua ottimizzazione, per migliorare l'efficienza della rigenerazione e ridurre la degenerazione dei calli.

Nel contesto dell'analisi dei costrutti utilizzati, è emersa una distinzione significativa nei loro effetti sulla callogenesi e sulla necrosi, influenzando i risultati della trasformazione e rigenerazione del pomodoro Beaufort. Il costrutto Inteina, utilizzato come controllo plasmidico, non ha influito negativamente sui processi di callogenesi, portando ad ottenere un'efficienza in questi termini superiore rispetto a quella osservata con gli altri costrutti (CP20 e Bc DCL1/2). Nei primi tempi di osservazione, la callogenesi mostrava livelli simili tra Inteina e CP20, ma, a partire dalla sesta settimana, il costrutto Inteina ha raggiunto e mantenuto una percentuale di callogenesi superiore al 50%, dimostrando una stabilità e una capacità di rigenerazione duratura. Questa performance potrebbe essere attribuita all'efficace controllo della regolazione ormonale e all'assenza di effetti negativi sul processo di proliferazione cellulare, in quanto l'Inteina non sembra interferire negativamente con i meccanismi cellulari necessari per la rigenerazione.

In contrasto, il costrutto CP20, che esprime un peptide antimicrobico, ha portato all'osservazione di un andamento discontinuo nell'efficienza di callogenesi. Sebbene inizialmente si osservasse la promozione della formazione di calli, la capacità nel sostenere un'alta efficienza di rigenerazione a lungo termine è risultata compromessa. La callogenesi osservata negli espianti infettati col costrutto CP20 ha subito una riduzione significativa dopo la sesta settimana, stabilizzandosi intorno al 20% alla dodicesima settimana. Questo andamento discontinuo potrebbe essere dovuto agli effetti inibitori del peptide antimicrobico sul processo di proliferazione e differenziazione cellulare. La presenza continua di CP20 potrebbe interferire con le vie di segnalazione biochimica cellulari, portando a una degenerazione prematura dei calli e limitando così la loro capacità di mantenere una rigenerazione efficace nel tempo.

Il costrutto Bc DCL1/2, a base di RNAi, ha evidenziato un andamento crescente e continuo nella callogenesi, raggiungendo circa il 40% e 60% rispettivamente alla dodicesima settimana. Questo risultato fa ipotizzare che tale costrutto RNAi non influisca negativamente sulla formazione del tessuto calloso, rendendo il costrutto Bc DCL1/2 più promettente rispetto a quello esprimente AMPs per la rigenerazione a lungo termine. Nonostante la percentuale di necrosi dei calli mostrasse un andamento simile, il costrutto Bc DCL1/2 ha dimostrato una capacità più consistente di sostenere la rigenerazione, suggerendo che l'approccio RNAi potrebbe portare ad una maggiore percentuale di callogenesi senza compromettere significativamente la vitalità del tessuto.

In sintesi, la comparazione dei tre costrutti ha rivelato che, mentre l'Inteina non influisce negativamente sulla callogenesi, l'espressione del CP20 sembra portare ad una rigenerazione meno consistente e più suscettibile alla degenerazione nel lungo termine. Il costrutto Bc DCL1/2 emerge come costrutto efficiente per la promozione della callogenesi continua e crescente. Questi risultati evidenziano l'importanza di selezionare e ottimizzare adeguatamente i costrutti genetici per migliorare l'efficienza della trasformazione e della rigenerazione nei programmi di miglioramento genetico delle piante.

Il processo di rigenerazione per organogenesi da callo condotto sul portinnesto di pomodoro Beaufort ha portato a risultati preliminari promettenti, con l'ottenimento di un germoglio a partire dal costrutto contenente Inteina. Questo risultato è indicativo del successo iniziale della proliferazione cellulare e dell'attivazione dei meccanismi rigenerativi nella pianta. Il germoglio ottenuto ha dimostrato una capacità di allungamento costante, supportata da un tasso di proliferazione efficiente, e ha raggiunto uno stadio di sviluppo tale da generare sub-germogli derivanti dal primo. Questo fenomeno di ramificazione rappresenta un importante indicatore di vitalità del tessuto rigenerato e di progressione del ciclo rigenerativo. Fino a questo momento, il processo si è dimostrato promettente non solo in termini di rigenerazione primaria, ma anche di capacità di mantenere la proliferazione e di potenziare la formazione di strutture secondarie.

Il processo di rigenerazione ha portato alla formazione di un unico germoglio a partire dal costrutto contenente Inteina (controllo plasmidico del CP20), mentre non si è ottenuta alcuna rigenerazione dal costrutto CP20 (AMPs); per Bc DCL1/2 (RNAi) è da notare che si è riuscito ad ottenere un germoglio nelle prime fasi di dedifferenziazione ma è stato perso quasi immediatamente per via della contaminazione batterica. Questo risultato suggerisce che il protocollo adottato permette di promuovere la rigenerazione di germogli da espianti trattati con questo costrutto ma che deve essere migliorata la fase di selezione e decontaminazione. Da questo risultato si può ipotizzare che esperimenti successivi, comprendenti una fase di selezione e decontaminazione più precisa, possono garantire la possibilità di ottenere anche nuove linee di Beaufort esprimenti il costrutto RNAi per il controllo della Botrite in pomodoro. La prima validazione dell'evento di trasformazione della nuova linea Beaufort-Inteina è stata effettuata analizzando per PCR l'integrazione del gene *nptII*, il gene marcatore di selezione, nel genoma della linea selezionata. La reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata impiegata per amplificare il segmento di DNA contenente il gene *nptII*. Successivamente, il prodotto della PCR è stato analizzato tramite elettroforesi su gel di agarosio. Questa procedura ha permesso di visualizzare il frammento amplificato, confermando la presenza del gene all'interno del genoma delle piante trasformate

I risultati hanno mostrato che le bande ottenute dall'elettroforesi corrispondono al frammento di DNA previsto, suggerendo che il gene *nptII* (540 pb) è stato inserito correttamente nel genoma della pianta ospite. L'assenza di bande non specifiche indica un'elevata specificità della PCR e, quindi, un'accurata integrazione del gene target. Inoltre, l'analisi ha dimostrato che l'integrazione è avvenuta in modo stabile, poiché il gene *nptII* è stato rilevato in tutte i campioni analizzati. Questo risultato conferma l'efficacia della trasformazione genetica mediata da *A. tumefaciens* utilizzando il costrutto Inteina, e suggerisce che il processo di trasformazione è stato eseguito con successo.

Le prove ottenute attraverso PCR ed elettroforesi hanno dunque validato l'integrazione stabile e funzionale del gene *nptII*, dimostrando che la trasformazione genetica ha avuto esito positivo e che il costrutto Inteina è stato effettivamente incorporato nel genoma della pianta ospite.

La scelta strategica di trasformare geneticamente il portinnesto si è basata sull'ipotesi che le molecole segnale (dsRNA o peptidi) per l'induzione di resistenza ai patogeni target possano essere trasferiti dal portinnesto alla marza, attraverso l'innesto. Questo approccio mira a potenziare la resistenza complessiva della pianta contro patogeni o stress ambientali, senza modificare direttamente il genoma della parte epigea (marza). La possibilità di trasmettere tratti benefici attraverso il sistema vascolare tra i due bionti dell'innesto rappresenta un'interessante opportunità per migliorare la resilienza della pianta, sfruttando sia i vantaggi fisiologici dell'innesto tradizionale sia quelli derivanti dall'ingegneria genetica, riducendo al minimo il rischio ambientale e per la salute dell'uomo in quanto la marza non è geneticamente modificata.

L'innesto è storicamente utilizzato principalmente per migliorare la tolleranza a stress ambientali e la capacità di assorbimento di nutrienti, mentre l'ingegneria genetica consente di introdurre resistenze specifiche a patogeni. L'integrazione di queste due tecniche permette di ottenere piante con un profilo di resistenza più completo e potenzialmente superiore rispetto ai metodi convenzionali. In particolare, l'uso di portinnesti modificati geneticamente potrebbe consentire di sfruttare l'ingegneria genetica senza modificare la marza, mantenendo inalterate le caratteristiche varietali della pianta produttiva, con vantaggi sia dal punto di vista prestazionale che logistico-economico, in quanto modificare direttamente il portinnesto significherebbe evitare di creare una nuova varietà per ogni marza, con risparmio di tempo e denaro.

Dal punto di vista normativo, questa combinazione di tecnologie ha implicazioni rilevanti. L'uso di portinnesti geneticamente modificati, con marze non geneticamente alterate, potrebbe consentire l'uso di innovazioni biotecnologiche senza far ricadere l'intera pianta nella categoria degli organismi geneticamente modificati (OGM). In un contesto normativo come quello europeo, dove le regolamentazioni sugli OGM sono particolarmente restrittive, questa strategia potrebbe rappresentare una soluzione praticabile per introdurre tratti di resistenza senza violare le normative attuali. Ciò potrebbe facilitare l'adozione di nuove tecnologie senza le barriere legali associate agli OGM, contribuendo allo sviluppo di pratiche agricole più sostenibili e resistenti agli stress biotici e abiotici.

In sintesi, il lavoro ha dimostrato una base solida per la trasformazione genetica e la rigenerazione del portinnesto di pomodoro Beaufort, ma ha anche messo in luce aree di miglioramento. Le ottimizzazioni apportate al protocollo hanno portato a risultati significativi, come la conferma dell'integrazione genetica e la rigenerazione parziale, ma sono necessari ulteriori sforzi per affinare le condizioni di coltura e i parametri del protocollo. Questi risultati non solo hanno contribuito a un miglioramento significativo della pratica di trasformazione e rigenerazione nel pomodoro, ma hanno anche fornito informazioni per future ricerche e applicazioni nel campo della biotecnologia vegetale.

BIBLIOGRAFIA

- Albuquerque, N., Pérez-Caselles, C., Faize, L., Ilardi, V., & Burgos, L. (2023). Trans-grafting plum pox virus resistance from transgenic plum rootstocks to apricot scions. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1216217.
- Angelini, R., & Magnifico, V. (2010). Pomodoro. *Coltura Cultura, Milan, Italy*.
- Ávalos-Rangel, A., Ruiz-Herrera, L.F., Gutiérrez-Alanis, D. *et al.* CLE14 Peptide Impairs Root Tip Regeneration and Callogenesis in Arabidopsis. *J Plant Growth Regul* *43*, 1458–1465 (2024).
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., & Roberts, J. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature biotechnology*, *25*(11), 1322-1326.
- Bevan, M., Barnes, W. M., & Chilton, M. D. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic acids research*, *11*(2), 369-385.
- Cappelletti R., Sabbadini S., Mezzetti B. (2015) Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). In: Wang K. (eds) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1224. Springer, New York, NY.
- Capriotti, L., Molesini, B., Pandolfini, T., Hailing, J., Baraldi, E., Cecchin, M., Mezzetti, B. & Sabbadini, S. (2024). RNA interference-based strategies to control *Botrytis cinerea* infection in cultivated strawberry. *Plant Cell Rep* *43*, 201.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642-655.
- COGEM (2006). New Techniques in Plant Biotechnology. COGEM Report CGM/061024-02, Vol. 2011, Bilthoven: Commissie Genetische Modificatie.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(11), 3240-3244.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *363*(1491), 557-572.
- Cordeiro, D., Alves, A., Ferraz, R., Casimiro, B., Canhoto, J., & Correia, S. (2023). An efficient agrobacterium-mediated genetic transformation method for *Solanum betaceum* Cav. Embryogenic callus. *Plants*, *12*(5), 1202.

- Cristescu, S. M., De Martinis, D., te Lintel Hekkert, S., Parker, D. H., & Harren, F. J. (2002). Ethylene production by *Botrytis cinerea* in vitro and in tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5342-5350.
- Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., & Goodman, H. M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of molecular and applied genetics*, 1(6), 561-573.
- Dulam S., Phanikanth J., Ajay K., Venkatapuram, Pandarinath S., Venkataiah P., Venkateswar R. A., Sadanandam A. (2022). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration system for genome engineering in tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 29, Issue 6, 103292, ISSN 1319-562X.
- El Oirdi, M., Bouarab, K. (2007). Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytol.* 175: 131–139.
- Faisal, M., Abdel-Salam, E. M., Alatar, A. A., Saquib, Q., Alwathnani, H. A., & Canto, T. (2019). Genetic transformation and siRNA-mediated gene silencing for aphid resistance in tomato. *Agronomy*, 9(12), 893.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811.
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International journal of plant genomics*, 2007(1), 064358.
- Foster, S. J., Park, T. H., Pel, M., Brigneti, G., Śliwka, J., Jagger, L., & Jones, J. D. (2009). Rpi-vnt1.1, a Tm-22 homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(5), 589-600.
- Fuentes, A., Ramos, P. L., Fiallo, E., Callard, D., Sanchez, Y., Peral, R., ... & Pujol, M. (2006). Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to Tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Research*, 15, 291-304.
- Gebremichael, D. E., Haile, Z. M., Negrini, F., Sabbadini, S., Capriotti, L., Mezzetti, B., & Baraldi, E. (2021). RNA interference strategies for future management of plant pathogenic fungi: Prospects and challenges. *Plants*, 10(4), 650.
- Gao, N., Shen, W., Cao, Y., Su, Y., & Shi, W. (2009). Influence of bacterial density during preculture on *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98, 321-330.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., & McCaffery, A. (2002). Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest management science*, 58(9), 859-867.
- Goldschmidt, E. E. (2014). Plant grafting: new mechanisms, evolutionary implications. *Frontiers in plant Science*, 5, 727.

- Haroldsen, V. M., Paulino, G., Chi-Ham, C. L., and Bennett, A. B. (2012). Survey of fruit and nut crops finds that grape, citrus and walnut lead in biotech research. *Calif Agr.* (in press).
- Haroldsen, V. M., Szczerba, M. W., Aktas, H., Lopez-Baltazar, J., Odias, M. J., Chi-Ham, C. L., & Powell, A. L. (2012). Mobility of transgenic nucleic acids and proteins within grafted rootstocks for agricultural improvement. *Frontiers in Plant Science*, 3, 39.
- Islam, M. T., & Sherif, S. M. (2020). RNAi-based biofungicides as a promising next-generation strategy for controlling devastating gray mold diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2072.
- Jha, S., & Chattoo, B. B. (2010). Expression of a plant defensin in rice confers resistance to fungal phytopathogens. *Transgenic research*, 19, 373-384.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Jung, Y. J. (2013). Enhanced resistance to bacterial pathogen in transgenic tomato plants expressing cathelicidin antimicrobial peptide. *Biotechnology and bioprocess engineering*, 18, 615-624.
- Kagami, H., Taguchi, K., Arakawa, T., Kuroda, Y., Tamagake, H., & Kubo, T. (2016). Efficient callus formation and plant regeneration are heritable characters in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Hereditas*, 153, 1-6.
- Kalaitzandonakes, N., Alston, J., and Bradford, K. (2007). Compliance costs for regulatory approval of new biotech crops. *Nat. Biotechnol.* 25, 209–211.
- Kehr, J., & Kragler, F. (2018). Long distance RNA movement. *New Phytologist*, 218(1), 29-40.
- Kent, M. (2020). Factors Regulating Initiation of Retina Regeneration in Zebrafish (Doctoral dissertation, Vanderbilt University).
- Klee, H., Horsch, R., & Rogers, S. (1987). Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology.
- Kodama, H., Miyahara, T., Oguchi, T., Tsujimoto, T., Ozeki, Y., Ogawa, T., & Ohta, D. (2021). Effect of transgenic rootstock grafting on the omics profiles in tomato. *Food Safety*, 9(2), 32-47.
- Kohli, A., Gahakwa, D., Vain, P., Laurie, D. A., & Christou, P. (1999). Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta*, 208, 88-97.
- Lee, J. M., Kubota, C., Tsao, S. J., Bie, Z., Echevarria, P. H., Morra, L., & Oda, M. (2010). Current status of vegetable grafting: Diffusion, grafting techniques, automation. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 93-105.
- Lee, S., Park, Y.S., Rhee, J.H. *et al.* Insights into plant regeneration: cellular pathways and DNA methylation dynamics. *Plant Cell Rep* 43, 120 (2024).

- Lemgo, G. N. Y., Sabbadini, S., Pandolfini, T., & Mezzetti, B. (2013). Biosafety considerations of RNAi-mediated virus resistance in fruit-tree cultivars and in rootstock. *Transgenic research*, 22, 1073-1088.
- Lev-Yadun, S., & Sederoff, R. (2001). Grafting for transgene containment. *Nat. Biotechnol.* 19, 1104.
- Li, J., Wang, C., Yang, L., Qiu, F., Li, Y., Zheng, Y. & Liang, W. (2023). Enhancing tomato resistance by exploring early defense events against Fusarium wilt disease. *Phytopathology Research*, 5(1), 24.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B. (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in plant science*, 8, 1418.
- Liu, P., & Nester, E. W. (2006). Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12), 4658-4662.
- Louws, F. J., Rivard, C. L., & Kubota, C. (2010). Grafting fruiting vegetables to manage soilborne pathogens, foliar pathogens, arthropods and weeds. *Scientia horticulturae*, 127(2), 127-146.
- Mansfield, J. W. (1980). Mechanism of resistance to *Botrytis*, p. 181-218. In J. R. Coley-Smith, K. Verhoeff, and W. R. Jarvis (ed.), *The biology of Botrytis*. Academic Press, New York, N.Y.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., & Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5138), 1432-1436.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S. H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., & Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, 262(5138), 1432-1436
- Matsumoto-Kitano, M., Kusumoto, T., Tarkowski, P., Kinoshita-Tsujimura, K., Václavíková, K., Miyawaki, K., & Kakimoto, T. (2008). Cytokinins are central regulators of cambial activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(50), 20027-20031.
- Mat Jalaluddin, N. S., Asem, M., Harikrishna, J. A., & Ahmad Fuaad, A. A. H. (2023). Recent Progress on Nanocarriers for Topical-Mediated RNAi Strategies for Crop Protection—A Review. *Molecules*, 28(6), 2700.
- Matzke, A. J., & Matzke, M. A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current opinion in plant biology*, 1(2), 142-148.
- Melnyk, C. W. (2017). Connecting the plant vasculature to friend or foe. *New Phytologist*, 213(4), 1611-1617.
- Mohr, S., Bakal, C., & Perrimon, N. (2010). Genomic screening with RNAi: results and challenges. *Annual review of biochemistry*, 79(1), 37-64.
- Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS microbiology letters*, 270(1), 1-11.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986, January). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. *Scientific reports*, 7(1), 482.
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., & Schweizer, P. (2010). HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *The Plant Cell*, 22(9), 3130-3141.
- Oda, M. (2002). Grafting of vegetable crops. *Scientia Horticulturae*, 51(3-4), 197-214.
- Opabode, J. T. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol Mol Biol Rev*, 1(1), 12-20.
- Pina, A., & Errea, P. (2005). A review of new advances in mechanism of graft compatibility–incompatibility. *Scientia Horticulturae*, 106(1), 1-11.
- Pitzschke, A. (2013). Agrobacterium infection and plant defense—transformation success hangs by a thread. *Frontiers in plant science*, 4, 519.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229-233.
- Rai, G. K., Rai, N. P., Kumar, S., Yadav, A., Rathaur, S., & Singh, M. (2012). Effects of explant age, germination medium, pre-culture parameters, inoculation medium, pH, washing medium, and selection regime on Agrobacterium-mediated transformation of tomato. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 48, 565-578.
- Rivero, R. M., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2003). Role of grafting in horticultural plants under stress conditions. *Journal of food agriculture and environment*, 1, 70-74.
- Rommens, C. M., Haring, M. A., Swords, K., Davies, H. V., & Belknap, W. R. (2007). The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding. *Trends in plant science*, 12(9), 397-403.
- Rosa, S., Pesaresi, P., Mizzotti, C., Bulone, V., Mezzetti, B., Baraldi, E., Masiero, S. (2022). Game-changing alternatives to conventional fungicides: small RNAs and short peptides. *Trends in Biotechnology*, March 2022, Vol. 40, No. 3
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.
- Sansavini S., Costa G., Gucci R., Inglese P., Ramina A., Xiloyannis C., (2014). *Arboricoltura generale*. Pàtron Editore, Bologna.
- Schwarz, D., Roupshael, Y., Colla, G., & Venema, J. H. (2010). Grafting as a tool to improve tolerance of vegetables to abiotic stresses: Thermal stress, water stress and organic pollutants. *Scientia Horticulturae*, 127(2), 162-171.

- Shah, S. H., Ali, S., Jan, S.A., Din, J., & Ali, G.M. (2015). Callus induction, in vitro shoot regeneration and hairy root formation by the assessment of various plant growth regulators in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill.) *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(2): 2015, Page: 528-538 ISSN: 1018-7081.
- Sharma M. K., Solanke A., U., Jani D., Singh Y. & Sharma A., K., (2009). A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. Department of Plant Molecular Biology, University of Delhi South Campus, Benito Juarez Road, New Delhi 110 021, India. Institute of Genomics and Integrative Biology, Delhi 110 007, India.
- Sim, S. C., Durstewitz, G., Plieske, J., Wieseke, R., Ganal, M. W., Van Deynze, A. & Francis, D. M. (2012). Development of a large SNP genotyping array and generation of high-density genetic maps in tomato. *PloS one*, 7(7), e40563.
- Singh, R.K., Prasad, M. Advances in *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of graminaceous crops. *Protoplasma* 253, 691–707 (2016).
- Smolka, A., Li, X. Y., Heikelt, C., Welander, M., & Zhu, L. H. (2010). Effects of transgenic rootstocks on growth and development of non-transgenic scion cultivars in apple. *Transgenic research*, 19, 933-948.
- Spiegelman, Z., Ham, B. K., Zhang, Z., Toal, T. W., Brady, S. M., Zheng, Y., ... & Wolf, S. (2015). A tomato phloem-mobile protein regulates the shoot-to-root ratio by mediating the auxin response in distant organs. *The Plant Journal*, 83(5), 853-863.
- Stotz, H. U., Thomson, J., & Wang, Y. (2009). Plant defensins: defense, development and application. *Plant signaling & behavior*, 4(11), 1010-1012.
- Taning, C. N. T., Mezzetti, B., Kleter, G., Smagghe, G., & Baraldi, E. (2021). Does RNAi-based technology fit within EU sustainability goals? *Trends in Biotechnology*, 39(7), 644-647.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37, 169-180.
- Tramper, J., Zhu, Y., Tramper, J., & Zhu, Y. (2011). Genetically Modified Crops and the European Union. *Modern Biotechnology: Panacea or new Pandora's box*, 49-66.
- Tsaballa, A., Xanthopoulou, A., Madesis, P., Tsaftaris, A., & Nianiou-Obeidat, I. (2021). Vegetable grafting from a molecular point of view: the involvement of epigenetics in rootstock-scion interactions. *Frontiers in plant science*, 11, 621999.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44(1), 135-162.
- Vidya, C. S., Manoharan, M., & Sita, G. L. (1999). Cloning and characterization of salicylic acid-induced, intracellular pathogenesis-related gene from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Journal of Biosciences*, 24, 287-293.
- Verma, K., Modgil, M. RNA interference (RNAi) mediated technique for combating plant diseases: Harnessing nanoparticles for effective delivery and enhanced efficacy. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 157, 53 (2024).

- Wang, M., Weiberg, A., Dellota Jr, E., Yamane, D., & Jin, H. (2017). Botrytis small RNA Bc-siR37 suppresses plant defense genes by cross-kingdom RNAi. *RNA biology*, *14*(4), 421-428.
- Wilson, R. C., & Doudna, J. A. (2013). Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, *42*(1), 217-239.
- Yin, Z., Meng, F., Song, H., Wang, X., Xu, X., & Yu, D. (2009). Expression of an RNAi construct targeting the nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus confers virus resistance in transgenic tobacco and tomato. *Archives of Virology*, *154*(12), 1965-1973.
- Zhao, D., & Song, G. Q. (2014). Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNA s and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry. *Plant biotechnology journal*, *12*(9), 1319-1328.
- Zhu, X., Jia, C., Duan, L., Zhang, W., Yu, P., He, M., ... & Zhao, E. (2016). Residue behavior and dietary intake risk assessment of three fungicides in tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) under greenhouse conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *81*, 284-287.
- Zou, F., Tan, C., Shinali, T. S., Zhang, B., Zhang, L., Han, Z., & Shang, N. (2023). Plant antimicrobial peptides: a comprehensive review of their classification, production, mode of action, functions, applications, and challenges. *Food & Function*, *14*(12), 5492-5515.
- Zupan, J. R., & Zambryski, P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology*, *107*(4), 1041.

SITOGRAFIA

- ISTAT
<http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33703>
- FAOSTAT
<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- European Commission. (2020). *The European Green Deal*.
https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en
- European Commission. (2020). *Genetically Modified Organisms*
https://food.ec.europa.eu/plants/genetically-modified-organisms_en
- Direttiva 2001/18/CE
<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0018:20080321:IT:PDF>
- Regolamento (CE) n. 1829/2003
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02003R1829-20080410>
- Regolamento (CE) n. 1830/2003
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1830&from=IT>