



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

Corso di Laurea Magistrale in Scienze Agrarie del Territorio

Curriculum: Produzione e Protezione delle Colture

**STUDIO DELL'ESPRESSIONE FENOTIPICA DEI GENI *FT1* e *FT2* IN
VARIETÀ E SEMENZALI DI FRAGOLA**

**STUDIES ON THE PHENOTIPICAL EXPRESSION OF *FT1* AND *FT2*
GENES IN STRAWBERRY VARIETIES AND SEEDLINGS**

Dott.:

Giammarco Giovanetti

Relatore:

Prof. Bruno Mezzetti

Correlatore:

Dott.ssa Silvia Sabbadini

Anno Accademico 2018/2019

Sommario

1. INTRODUZIONE	4
1.1 Caratteristiche generali della fragola	4
1.1.1 Origine dell'ibrido <i>Fragaria x ananassa</i>	4
1.1.2 Caratteristiche botaniche	6
1.2 La fioritura in fragola.....	8
1.2.1 Fitoregolatori coinvolti nel processo di fioritura	11
1.2.2 Basi molecolari dell'induzione a fiore (geni <i>FT</i>)	13
1.3 Organismi geneticamente modificati.....	16
1.3.1 Biotecnologie genetiche applicate alla fragola.....	17
1.3.2 Trasformazione genetica	18
1.3.3 Geni marcatori di selezione e geni reporter.....	20
1.3.4 Promotore e terminatore.....	21
1.3.5 Le nuove biotecnologie per la trasformazione genetica.....	22
1.3.6 Cisgenesi e intragenesi.....	22
1.3.7 RNA interference (RNAi)	23
1.3.8 CRISPR-Cas9	24
1.4 Rigenerazione da tessuti somatici	27
2. SCOPO DELLA TESI	29
3. MATERIALI E METODI.....	30
3.1 SPERIMENTAZIONE 1: validazione dei geni <i>FT1</i> e <i>FT2</i> mediante caratterizzazione fenotipica di linee trasngeniche della cv. Sveva	30
3.1.1 Materiale vegetale.....	30
3.1.2 Metodo di valutazione dell'espressione fenotipica.....	31
3.1.3 Analisi statistica.....	32
3.2 SPERIMENTAZIONE 2: ottimizzazione di un protocollo di trasformazione genica, mediato da <i>A.tumefaciens</i> , della cv. Romina per la validazione del gene <i>FT1</i>	33
3.2.1 Materiale vegetale.....	33
3.2.2 Soluzioni stock.....	33
3.2.3 Terreni utilizzati nel protocollo di trasformazione	35
3.2.4 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> : ceppo, vettore e agente selettivo	37

3.2.5	Protocollo di trasformazione	38
3.2.6	Rilievo dati e analisi statistica	45
3.3	SPERIMENTAZIONE 3: valutazione della segregazione del costrutto 35S::FT1, in semenzali di fragola, ibridi tra la cv. Rociera e 3 linee GM della cv. Sveva	45
3.3.1	Materiale vegetale.....	45
3.3.2	Metodi di valutazione dei semenzali.....	47
4.	RISULTATI E OSSERVAZIONI.....	48
4.1	SPERIMENTAZIONE 1: - Valutazione fenotipica delle linee FT2	48
4.1.1	Altezza media pianta.....	48
4.1.2	Altezza media del picciolo fogliare	49
4.1.3	Altezza e larghezza media delle foglioline centrali	50
4.1.4	Numero medio di foglie	52
4.1.5	Numero medio di Infiorescenze.....	53
4.1.6	Numero medio di stoloni.....	53
4.2	SPERIMENTAZIONE 1: Valutazione fenotipica delle linee FT1	54
4.2.1	Altezza media pianta.....	54
4.2.2	Altezza media del picciolo fogliare	55
4.2.3	Altezza e larghezza media delle foglioline centrali	56
4.2.4	Numero medio di foglie	58
4.2.5	Numero medio di germogli	58
4.2.6	Numero medio di infiorescenze.....	59
4.2.7	Numero medio di fiori.....	60
4.2.8	Numero medio di catene stolonifere	61
4.2.9	Numero medio di frutti maturi.....	62
4.3	SPERIMENTAZIONE 2: Nuove linee FT1 della cv. Romina	63
4.4	SPERIMENTAZIONE 3: Analisi segregazione del gene <i>FTI</i> in popolazioni d'incrocio mediante valutazione fenotipica.....	73
5.	DISCUSSIONI	75
5.1	SPERIMENTAZIONE 1: Caratterizzazione fenotipica delle linee di fragola FT1 e FT2 cv. Sveva	75
5.2	SPERIMENTAZIONE 2: Trasformazione della cv. Romina con il gene <i>FTI</i> 77	

5.3 SPERIMENTAZIONE 3: Segregazione del costrutto 35S::FT1 in popolazioni di semenzali da <i>Rociera x Sveva FT1</i>	83
6. CONCLUSIONI.....	84
7. BIBLIOGRAFIA.....	87

1. INTRODUZIONE

L'interesse economico che ha riscontrato la fragola coltivata, negli ultimi anni, giustifica pienamente i numerosi programmi di breeding, privati e pubblici, messi in atto su questa specie in Italia e nel mondo. I principali obiettivi di questa intensa attività di ricerca genetica, mirano all'ampliamento degli areali pedoclimatici di coltivazione della specie, all'ampliamento del calendario di maturazione, al miglioramento delle performance produttive e delle qualità organolettiche dei frutti di *Fragaria x ananassa*, specie ottoploide ($2n = 8x = 56$). Negli ultimi anni, la specie diploide *Fragaria vesca* è stata oggetto di intensa ricerca scientifica che ha portato allo sviluppo di importanti strumenti di genetica e genomica, come le mappe genetiche e il sequenziamento del genoma (Shualey *et al.*, 2011). Il successivo trasferimento dei risultati ottenuti alla specie coltivata *Fragaria x ananassa*, è stato possibile grazie all'elevato grado di omologia e collinearità, tra il genoma della fragola coltivata (*Fragaria x ananassa Duch.*) e quello della specie diploide (*Fragaria vesca*) (Shualey *et al.*, 2011).

1.1 Caratteristiche generali della fragola

1.1.1 Origine dell'ibrido *Fragaria x ananassa*

La Fragola è una pianta che appartiene alla famiglia delle *Rosaceae*, sottofamiglia *Rosoidae*, genere *Fragaria*; tutte le varietà presenti attualmente in commercio derivano dalla specie *Fragaria x ananassa*, ibrido interspecifico originatosi, oltre due secoli fa, dall'incrocio casuale di due specie ottoploidi, dioiche, spontanee, originarie dell'America. Essa è una specie oggetto di interesse ortofrutticolo solo da pochi decenni, in passato fino alla fine del Cinquecento non aveva ancora né una giusta collocazione sistematica, né una valorizzazione agronomica; infatti era conosciuta, in Europa, come frutto edule spontaneo del sottobosco (fragolina di bosco). La pianta era utilizzata, nei giardini, per abbellire le bordure delle aiuole, dando rilevanza alla fioritura primaverile, più che alla produzione, solo verso la fine del Seicento è stato dato un senso produttivo alla pianta, utilizzando i suoi frutti, inizialmente, come elementi di abbellimento dei piatti e delle portate, fino ad arrivare all'epoca moderna dove il frutto è utilizzato come elemento principale di un piatto o, consumato fresco,

come un frutto. Le due specie ottoploidi da cui derivano tutte le principali varietà utilizzate nella fragolicoltura moderna sono *F. virginiana* e *F. chiloensis*. *F. virginiana* è una specie spontanea proveniente dagli Stati Uniti Orientali, mentre *F. chiloensis* è una specie spontanea proveniente dalle coste cilene del Pacifico, il suo carattere distintivo è l'insolita dimensione dei frutti, molto maggiore rispetto a quelli delle specie spontanee conosciute in Europa, questo carattere fenotipico della *F. chiloensis* attirò l'attenzione di un militare francese ufficiale del genio, Amédée François Frézier, nei primi del '700, il quale descrisse il frutto come: “ fragola del Cile con frutto grande, con foglie irsute e coriacee, comunemente chiamato frutilla” (Andreotti *et al.*, 2010); l'ufficiale trovatosi in Cile ne raccolse e ne conservò pochi esemplari che portò con se nel viaggio oltreoceano verso il continente Europeo, dove per i primi decenni la sua coltivazione fu incerta e casuale fino ad arrivare al 1766, anno in cui è stato svolto il primo studio su questa specie da Antoine Nicolas Duchesne, giardiniere del Re di Francia, Luigi XVI, egli si dedicò allo studio di tutto il genere, cercando di registrare le caratteristiche botaniche delle diverse specie conosciute all'epoca includendo anche nozioni sulle stagioni di fioritura e fruttificazione, sugli effetti dei vari elementi metereologici e ipotesi dell'origine delle diverse specie conosciute. Duchesne, cercando di condensare le sue esperienze nel disegno di un albero genealogico, fu il progenitore della fragolicoltura moderna, basata sulla specie derivante dall'incrocio interspecifico (ibridazione) di *F. virginiana* x *F. chiloensis*. Successivamente fu utilizzata, nell'attività di breeding, una terza specie ottoploide, *F. virginiana* subsp. *Gluaca* Staudt, per introdurre il carattere rifiorente (day neutral – indifferente al fotoperiodo), in *F. x ananassa*. Le specie spontanee in Europa sono poche, di cui, la più diffusa è *F. vesca* o fragolina di bosco, specie diploide il cui habitat naturale è il sottobosco, caratterizzata da fiori ermafroditi e frutti di piccola dimensione; questa specie vanta numerosi biotipi che differiscono tra loro per diverse caratteristiche, proprie della sottospecie e della varietà, come: la colorazione del frutto bianca (*F. sylvestris* var. *alba* o fragola bianca) o rossa (*F. sylvestris* var. *semperflorens* o fragola rifiorente), la capacità di emettere stoloni o meno (varietà Alpina), il carattere rifiorente (*semperflorens*). Le altre specie sono *F. moschata* Duch. specie esaploide dal gusto moscato con dimensione del frutto maggiore rispetto la fragolina di bosco, *F. viridis* Duch. e *F. nigerrensis* (Andreotti *et al.*, 2010).

1.1.2 Caratteristiche botaniche

La Fragola è una pianta appartenente alla forma biologica delle emicriptofite reptanti. È una pianta perennante per mezzo di gemme poste a livello del terreno, che presenta fusti striscianti, dicotiledone perenne, considerata, erroneamente, di tipo erbaceo. Essa è costituita da un apparato radicale fascicolato, da un fusto raccorciato (corona o rizoma), da un apparato fogliare, da stoloni radicanti, da un'infiorescenza e dai frutti. L'apparato radicale è formato da radici fascicolate che si sviluppano dalla corona, vicino la superficie del terreno, penetrando, a seconda delle caratteristiche del suolo (penetrazione radicale maggiore in terreni argillosi e sabbiosi), i primi 25-30 cm (fino a 50 cm in terreni sabbiosi) della rizosfera. Si distinguono in radici primarie, originatesi direttamente dalla corona e radici secondarie, per diramazione di quelle primarie; questo apparato svolge la fondamentale funzione di assorbimento dell'acqua e dei, macro e microelementi, presenti nel suolo (fondamentali per lo sviluppo vegetativo e la fruttificazione) e la funzione di immagazzinamento delle sostanze di riserva, principalmente saccaridi e lipidi. La capacità, maggiore o minore, di formare nuove radici è principalmente legata alla varietà coltivata, all'ambiente pedoclimatico (genotipo-ambiente) e alla tecnica colturale, come anche la capacità di formare nuovi germogli dalla corona. La corona o rizoma sporge dal terreno fino al massimo 10 cm, per alcuni cloni di *F. chiloensis* che non accestiscono e allungano il fusto, è un organo di riserva caratterizzato da forte vascolarizzazione linfatica che, sviluppandosi, porta ad un accrescimento, in diametro, del colletto e alla formazione di nuovi germogli (accestimento); i quali, in determinate condizioni ambientali, formeranno uno stolone (fusto strisciante sul terreno) da cui, ad ogni nodo, si originerà una piantina. La capacità di emettere stoloni è caratteristica della maggior parte delle varietà coltivate, anche se, alcune antiche varietà rifioventi (longidiurne) non sono in grado di emetterli e quindi si propagano per divisione dei germogli. Le foglie, pinnate o palmate, inserite su un picciolo, di lunghezza variabile, sono suddivise in tre o più foglioline, di forma ovale, più o meno allungata. Queste sono ricche di stomi e permettono alla pianta di svolgere un'intensa traspirazione. Alla base delle foglie, a ridosso della corona, si formano delle gemme che in base al fotoperiodo, quindi in base al numero di ore in luce e ai valori di temperatura giornalieri, potranno dare origine a infiorescenze

produttive, a stoloni (propagazione vegetativa) o a germogli. Lo stolone è un germoglio lungo, sottile e strisciante sul suolo, costituito da due nodi e due internodi, il primo nodo porta, di solito, una gemma dormiente o sterile, il secondo è dotato di una gemma con cellule meristematiche pronte a differenziare e generare una nuova piantina (con lo stesso genotipo), in condizioni ambientali favorevoli, o un nuovo stolone, nel caso in cui trovi condizioni avverse allo sviluppo. Questo tipo di propagazione, vegetativa, consente di ottenere piante cloni della pianta madre, con lo stesso corredo genetico. L'emissione delle catene stolonifere avviene durante la fase vegetativa (in estate), dopo la fase di fruttificazione; infatti, la fragola, attualmente è propagata principalmente per via vegetativa, sfruttando la capacità di emettere stoloni, caratteristica di molte cultivar unifere. Nel caso in cui le piante non riescono a fruttificare, ad esempio a conseguenza di un diradamento dei fiori, la capacità di emettere stoloni aumenta notevolmente, in quanto, tutte le gemme si orienteranno verso uno sviluppo vegetativo. L'habitus vegetativo della pianta può essere definito assurgente o espanso a seconda del portamento, eretto o prostrato, del fogliame che, a sua volta, potrà essere definito rado o folto, in base alla densità delle foglie. I fiori sono riuniti in infiorescenze e si sviluppano dalla gemma, da punti di inserzione differenti, formando i racemi, costituiti da un numero variabile di fiori, da 3 a 8, collocati su assi con lunghezze differenti, influenzate dal carattere ereditario o dal periodo in cui si sono formati; essi vengono suddivisi in primari, secondari, terziari, in relazione al loro sviluppo scalare, che porta ad una scalarità di produzione, con differenze morfologiche significative dei frutti, a seconda del grado di scalarità. Il frutto primario è sempre di dimensioni maggiori e con forma spesso irregolare. Il fiore delle cultivar utilizzate nella fragolicoltura moderna è definito fiore perfetto (ermafrodita) perché costituito sia da organi gamici maschili (stami), che femminili (pistilli), ma vi sono varietà antiche, anche di *Fragaria x ananassa* o cloni di altre specie (dioiche), che presentano un fiore imperfetto con soli organi staminiferi o pistilliferi portati da individui diversi. Ogni fiore ermafrodita è costituito da un calice composto da numerosi sepali più o meno grandi con margine intero o frastagliato, da una corolla di dimensione variabile, piccola, media o grande, con un numero di petali da 5 (tipico delle Rosacee) a 10, bianchi nella maggior parte delle varietà o rosati/rossi, di forma ellittica, ovale o arrotondata; verso l'interno troviamo numerosi stami, ciascuno costituito da un

filamento portante l'antera, che contiene il polline. Internamente alla corona, delimitata dagli stami, c'è il ricettacolo; esso è costituito da pistilli, disposti a spirale, ciascuno composto da stigma (da cui entra il polline), stilo e ovario, contenente un ovulo che, una volta fecondato, darà origine ad un achenio, comunemente chiamato seme. L'achenio, in realtà, rappresenta il vero e proprio frutto secco e indeiscente, di colore variabile (nero, verde, giallo, rosso), derivante dalla fecondazione dell'ovario. La parte edule dell'infruttescenza deriva dallo sviluppo del ricettacolo, che porterà sulla sua superficie gli acheni sporgenti, affioranti o immersi, a seconda dei fattori di crescita ambientali e della cultivar. Le caratteristiche morfologiche delle infruttescenze variano notevolmente a seconda delle varietà, grazie al lavoro di selezione attuato negli ultimi anni, ma anche a seconda del luogo di impianto della coltura e delle tecniche colturali adottate. Per avere frutti di forma regolare è necessario che tutti i pistilli vengano fecondati; se la fecondazione avviene in maniera non uniforme darà origine a frutti deformati, non commerciabili. Le dimensioni del frutto possono essere molto piccole, piccole, medie, grosse o molto grosse; può avere forma reniforme, sferoidale, conico-arrotondata, conica, conica-allungata, biconica, quasi cilindrica, cuneiforme, ovoidale; il colore può variare dall'aranciato chiaro, al rosso-aranciato al rosso intenso (Andreotti *et al.*, 2010).

1.2 La fioritura in fragola

La maggior parte delle varietà di fragola, coltivate oggi, appartengono alla specie, *Fragaria x ananassa*. Questa specie è ampiamente coltivata in tutto il mondo ed è caratterizzata da un vasto assortimento varietale, in grado di offrire un adattamento, alle condizioni pedoclimatiche, di molti areali di coltivazione. Le cultivar di fragola, oggi, sono classificate, oltre che in base alle caratteristiche pomologiche, delle infruttescenze, anche in base al fotoperiodo, in:

- Cultivar Brevidiurne (Short Day) – Unifere;
- Cultivar Neutrodiurne (Day Neutral) – Rifioventi;
- Cultivar Longidiurne (Long Day) – Rifioventi;

e in base al periodo di maturazione, in:

- Cultivar a maturazione precoce;

- Cultivar a maturazione intermedia;
- Cultivar a maturazione tardiva;
- Cultivar a maturazione molto tardiva.

Le cultivar brevidiurne, sono unifere, quindi fioriscono una sola volta all'anno (SINGLE CROPPING, SC); queste, inducono la differenziazione delle gemme, a fiore, in condizioni di giorno corto, con fotoperiodo inferiore a 14 ore di luce, con un fotoperiodo ottimale compreso tra le 8 e le 11 ore di luce. In queste cultivar, per l'induzione a fiore, sono necessari da 7 a 14 foto-cicli (giorni con meno di 14 ore di luce). La differenziazione delle gemme, florigene, dipende, anche, dall'andamento delle temperature medie giornaliere e dalle escursioni termiche tra giorno e notte. Le temperature, medie, ottimali sono comprese tra 14 e 20 °C, mentre, con temperature inferiori a 10 °C e/o superiori a 27°C, le piante bloccano il processo di differenziazione delle infiorescenze. Le escursioni termiche giornaliere ottimali variano dai 18 - 13 °C ai 21 - 16 °C. Questa dipendenza dal fotoperiodo e dal termoperiodo, delle cultivar brevidiurne, nel nostro emisfero (emisfero boreale), induce la differenziazione dei primordi dell'infiorescenza, nella stagione autunnale, dai primi freddi di settembre, fino all'entrata in dormienza; per poi riprendere la differenziazione in primavera, fino alla schiusura delle gemme, differenziatesi nell'autunno precedente. Le condizioni ambientali di temperatura e fotoperiodo sono importanti per le cultivar a giorno corto, tanto che, da studi effettuati sulla cultivar Elsanta, si è potuto sviluppare un modello matematico dove, inserendo i vari parametri ambientali con quelli produttivi (sistema di coltivazione, tipo di piante, data di piantagione ecc.), si può prevedere l'inizio della produzione (*Figura 1*) e le quantità prodotte (Battey *et al.*, 1998).

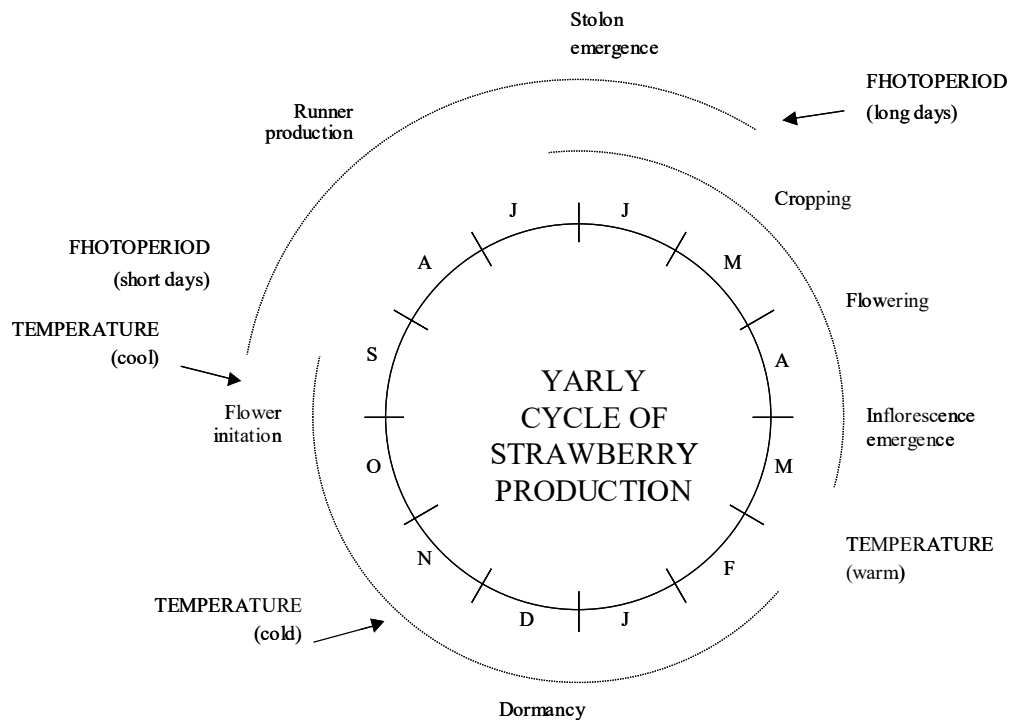


Figura 1: Ciclo di produzione della fragola unifera (Short Day) da Battey, 1998.

La maturazione delle cultivar unifere dipende dal genotipo e dalla lunghezza del periodo di differenziazione dei primordi dell'infiorescenza (25-50 giorni); più ci avviciniamo ai poli terrestri, più questo periodo tende a ridursi, in quanto, il numero di giorni con ore di luce e temperatura favorevoli alla differenziazione (da settembre in poi) risulta essere piuttosto limitato. In alcuni casi, con determinate condizioni pedoclimatiche e/o in base alle tecniche di coltivazione adottate (es. ambiente protetto), le cv. unifere, possono fiorire una seconda volta, alla fine della prima raccolta. Le cv. che esprimono questo carattere, sono definite bi-florenti (DOUBLE CROPPING, DC), e subiscono un secondo processo di differenziazione a fiore, dei meristemi ascellari, all'ingresso in primavera, con condizioni di termoperiodo e fotoperiodo favorevoli. Le infiorescenze che saranno originate da questo, secondo, processo di differenziazione, fioriranno successivamente alla prima raccolta e saranno caratterizzate da assi primari molto lunghi e assi secondari corti e presenti in numero ridotto; queste caratteristiche delle infiorescenze è dovuto alla breve durata del periodo di differenziazione, rispetto a quelle differenziate nel periodo autunnale. Il fenomeno della bi-fiorezza è frequente negli ambienti del sud Italia, in coltura protetta. Le

cultivar rifioranti, neutrodiurne (day neutral, DN), sono varietà foto-indifferenti, quindi, svincolate dal fotoperiodo per il processo di differenziazione a fiore; ma il termoperiodo, rimane comunque un fattore limitante, per queste varietà; infatti tale fattore, le porta ad avere un comportamento simile alle cultivar longidiurne, rifioranti, ma, con una produzione più continua di fiori e frutti e diversi gradi di intensità di fioritura, classificati in: debole, intermedia e forte (MULTIPLE CROPPING, MC). L'entrata in dormienza, delle cultivar rifioranti, foto-indifferenti, è tardiva, perchè il periodo di maturazione è molto ampio, alcune di queste hanno anche una spiccata capacità stolonifera. Le cultivar rifioranti, longidiurne (everbearing, EB), invece, non sono svincolate dal fotoperiodo e inducono la differenziazione delle infiorescenze in condizioni di giorno lungo, fotoperiodo maggiore alle 14 ore di luce. Queste, nel nostro emisfero (emisfero boreale), fruttificano dalla stagione primaverile a quella autunnale, dando performance produttive e qualitative inferiori alle cv. unifere. Le varietà con questa attività florigena, si è visto che hanno una scarsa, o nulla, emissione di catene stolonifere, caratteristica che ostacola la loro propagazione vegetativa (Taylor e D.R., 2002).

1.2.1 Fitoregolatori coinvolti nel processo di fioritura

Lo sviluppo vegetativo e riproduttivo di una pianta e le sue risposte a stimoli, biotici e abiotici, sono regolati dall'interazione di un complesso di segnali, esogeni (fotoperiodo, temperature) ed endogeni che, insieme, intervengono nella regolazione dell'espressione genica e nella regolazione delle funzioni metaboliche alla base della fisiologia e della fenologia degli organismi vegetali. I segnali endogeni, sono controllati da molecole presenti in bassissime concentrazioni nell'organismo, chiamate fitoregolatori o PGR (*plant growth regulator*), ascrivibili a cinque gruppi principali: Auxine (IAA), Gibberelline (GA), Citochinine (CK), Acido Abscissico (ABA) ed Etilene. Altri composti che svolgono una funzione di segnale, sono gli zuccheri e alcuni minerali, che interagiscono, a livello fisiologico, con i fitoregolatori.

- Gibberelline (GA):

è la classe di ormoni maggiormente coinvolta nel processo di fioritura della fragola. Questi ormoni sono stati associati sia allo sviluppo vegetativo, sia all'inibizione della fioritura (Guttridge and Thompson *et al.*, 1959). Gli effetti delle GA sono stati

osservati esaminando la risposta delle piante di fragola a somministrazioni esogene (sull'apparato fogliare), di questi ormoni e dall'analisi di sostanze simili, trovate nei tessuti delle piante in diverse fasi dello sviluppo. In generale, l'applicazione di gibberelline a livello fogliare, mima l'effetto del giorno lungo sulla crescita vegetativa e riproduttiva nelle varietà brevidiurne. È stato dimostrato che, in queste cultivar, l'induzione a fiore è stata inibita dalla somministrazione di GA per via esogena, nonostante ci fossero le condizioni di luce adatte. Attraverso altre sperimentazioni è emerso che, anche nelle varietà neutrodiurne la fioritura è inibita dalle GA (Guttridge and Thompson, 1959). Applicazioni fogliari di GA in campo, a novembre, hanno portato a uno sviluppo migliore dei fiori e quindi, a un aumento del numero di frutti (Singh *et al.*, 1960). Il risultato probabilmente, è dovuto ad un migliore sviluppo dei fiori e non all'induzione fiorale visto che, le piante erano state, prima del trattamento, sottoposte a quattro settimane induttive di giorno breve. Nella somministrazione di GA non sono stati visti effetti sulle rese delle cultivar longidiurne. Il ruolo delle giberelline è stato analizzato anche dal punto di vista degli inibitori della sua biosintesi. AMO1618 (inibitore della biosintesi di GA) ha aumentato l'induzione a fiore in cultivar brevidiurne fatte crescere sotto condizioni non induttive cioè, con fotoperiodi lunghi (Avigdori-Avidov *et al.*, 1977).

- **Citochinine:**

le citochinine (CK) sono principalmente responsabili della divisione e differenziazione cellulare, nelle piante. Le prove del loro coinvolgimento nel processo di induzione a fiore risultano essere scarse. I primi a scoprire delle fluttuazioni, di questo ormone, durante la fase di induzione a fiore (Yamasaki e Yamashita, 1993), ipotizzarono che questi, potessero avere anche un ruolo in questa fase fenologica.

- **Auxine:**

le auxine (IAA) sono dei fitormoni che hanno svariati ruoli, il più importante è il controllo della dominanza apicale. Moore e Hough (1962) notarono che il livello di auxine, sugli apici meristemati di piante di fragola, in condizioni favorevoli la fioritura, risultava essere in calo dopo 15 cicli di luce (induzione a fiore) ma, in aumento da quel momento in poi. Altre sperimentazioni dimostrarono che la somministrazione esogena, di auxine, su foglie di varietà brevidiurne, in condizioni di giorno corto, causarono la riduzione sia di fiori che di acheni, suggerendo che le auxine

fungano da inibitori alla fioritura (Tafazoli e Vince-Prue, 1978); risultati recenti, basati sull'aumento dell'espressione endogena di auxine in tessuti ovarici di fragola e lampone, geneticamente modificate con il gene *DefH9-iaaM*, hanno dimostrato che l'espressione endogena delle auxine nella fase d'induzione ha un ruolo positivo nel differenziamento a fiore e sulla fertilità delle piante (Mezzetti *et al.*, 2004).

1.2.2 Basi molecolari dell'induzione a fiore (geni *FT*)

Negli organismi vegetali, il successo riproduttivo è determinato dai processi di induzione a fiore, dallo sviluppo dell'androceo e del gineceo, dalla fioritura, e dall'allegagione; fasi critiche dello sviluppo, che devono svolgersi nelle adeguate condizioni di temperatura e fotoperiodo, proprie della specie. In *Fragaria x ananassa* la fase di transizione dei meristemi, dalla differenziazione di foglie alla formazione di fiori, è quindi di vitale importanza. Il modello di fioritura è la conseguenza dell'influenza del fotoperiodo e di sostanze sconosciute, dette florigene, che sono prodotte nelle foglie e trasmesse agli apici dei germogli (Chailakhyan *et al.*, 1968). La fioritura è stata studiata in maniera approfondita sulla pianta *Arabidopsis thaliana*, piccola pianta annuale o biennale, appartenente alla famiglia delle Brassicacee, detta comunemente arabetta comune. Sebbene non abbia alcuna particolare importanza agronomica è molto studiata, in quanto è utilizzata come organismo modello perlopiù in studi di genomica funzionale. Questa pianta ha un numero di geni che regolano l'induzione della fioritura, denominati geni *FT*. Questi geni detti *FLOWERING LOCUS T (FT)*, sono coinvolti in differenti vie metaboliche riguardanti la fioritura; il prodotto di un gene *FT*, è ampiamente riconosciuto come gene florigeno o come il principale componente di un segnale più complesso (Zevaart *et al.*, 2008; Coupland *et al.*, 2008). Altri studi effettuati su pomodoro neutrodiurno, hanno aiutato a comprendere che i geni *CETS*, in generale, e ortologi di *FT*, in particolare, hanno un ruolo nell'architettura della pianta oltre che nell'induzione a fiore. *Arabidopsis* è una pianta longidiurna facoltativa; giornate lunghe (con 14 o più ore di luce) stimolano la transizione dei meristemi verso la crescita riproduttiva. In questa pianta è stato identificato il gene *CONSTANS (CO)*, utilizzato per formulare il modello delle combinazioni esterne, che illustra il meccanismo dell'induzione a fiore. *CO* si esprime con periodicità circadiana cioè, con un ciclo che si compie in 24 ore regolato da

GIGANTEA (GI) (Sawa *et al.*, 2007). In giornate con poche ore di luce, a fine giornata, il trascritto prodotto da *CO* si accumula nelle foglie e dopo il tramonto inizia ad essere tradotto in proteina; ma in assenza di luce, la proteina *CO* è rapidamente degradata (Suarez-Lopez, 2001). Invece, nei giorni più lunghi le piante sono esposte alla luce per un numero maggiore di ore, si accumula trascritto codificante per la proteina *CO* alla fine della giornata e inizia ad essere prodotta la proteina *CO* quando non è ancora buio; quindi la proteina *CO*, a differenza del caso precedente, è stabilizzata dalla luce, non si degrada e può promuovere l'espressione di *FT* (Liu *et al.*, 2008; Wiggie *et al.*, 2005). La proteina *FT* si muove inizialmente nel floema, poi per via simplastica, fino a raggiungere la regione meristemica della pianta (Jaeger *et al.*, 2007). Questa poi, interagisce con un fattore di trascrizione bZIP, chiamato *FD* (Abe *et al.*, 2005); il complesso *FT/FD*, promuove direttamente l'espressione di *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (SOC1)*, *FUITFUL (FUL)* e, infine, i geni di identità floreale meristemica *APETALA (AP1)* (Wiggie *et al.*, 2005) e *LEAFY (LFY)* (Weigel *et al.*, 1995). I geni *LFY* e *AP1* intensificano reciprocamente la loro espressione (Wagner *et al.*, 1999) stabilizzando così, il cambiamento che provoca la formazione del fiore (Figura 2).

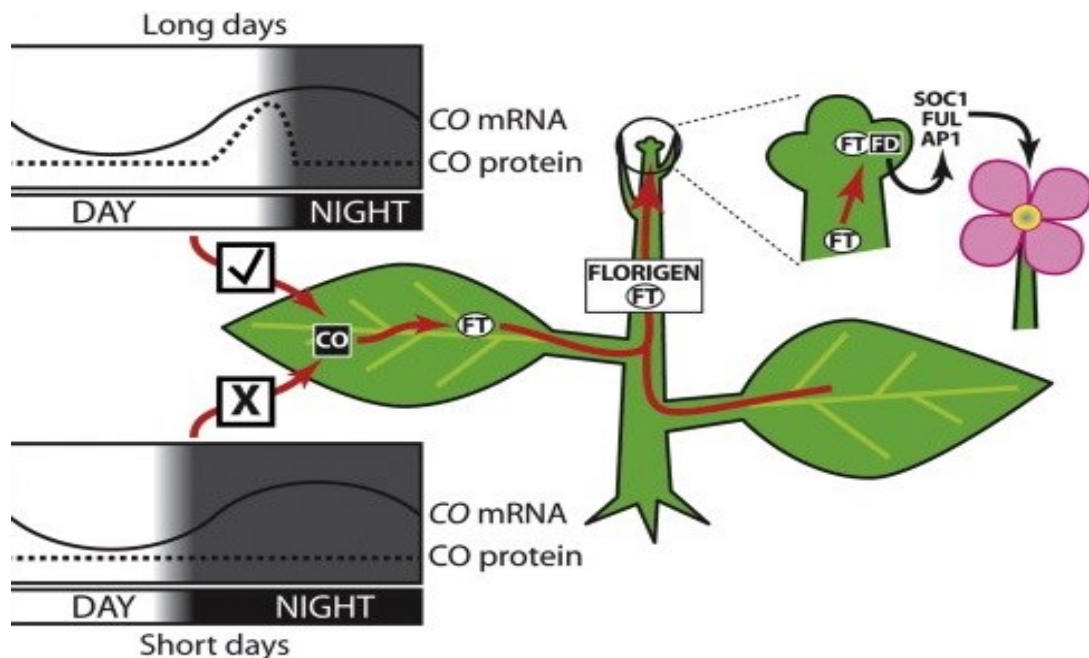


Figura 2: Modello che spiega la fioritura, controllata dal fotoperiodo, in *Arabidopsis* pianta longidiurna facoltativa (McGarry *et al.* 2012).

Nella pianta modello *Arabidopsis*, la fioritura è controllata dai geni della famiglia *CETS*, composta da: *FT*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, *CENTRORADIALS (ATC)*, *MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)* e *BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT)*. La funzione di *TFL1* è antagonista a quella di *FT* (Kardailsky *et al.*, 1999). In *Arabidopsis* i mutanti *TFL1* portano fiori solitari dove, normalmente dovrebbero esserci delle infiorescenze e il meristema apicale dell'infiorescenza, termina come un fiore solitario (Alvarez *et al.*, 1992); infatti, *TFL1* è maggiormente espresso nei tessuti a fine fioritura (Benlloch *et al.*, 2007). Quindi, il gene *FT* promuove l'induzione a fiore dei meristemi mentre, il gene *TFL1* sopprime l'espressione di *FT*, mantenendo i meristemi in uno stato indeterminato. L'espressione costitutiva di *FT* è in grado di promuovere la fioritura in molte piante, tra cui legnose (perenni), erbacee, leguminose e ornamentali. Nello sviluppo delle piante la fase di transizione florale e l'architettura dell'infiorescenza quindi, sono modulate da due proteine omologhe, *FLOWERING LOCUS T (FT)* e *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Il florigene *FT*, promuove la transizione verso lo sviluppo riproduttivo e la fioritura mentre, *TFL1* reprime questa transizione. Nonostante la loro importanza per l'adattamento delle piante e il miglioramento delle colture, il loro ampio studio da parte della comunità scientifica sui meccanismi molecolari che controllano le azioni opposte di *FT* e *TFL1*, sono rimasti ancora incerti. Recenti studi su più specie hanno dimostrato diversi ruoli della famiglia genetica *FT / TFL1*, in processi di sviluppo diversi dalla regolazione della fioritura. Inoltre, la notevole evoluzione degli omologhi *FT* si è verificata indipendentemente in diverse specie durante l'evoluzione delle piante da fiore. Questi rapporti indicano che, questa famiglia genica (*FT / TFL1*), è un importante bersaglio dell'evoluzione in natura. Oltre a operare in diversi processi di sviluppo, *FT* e *TFL1* si sono evoluti dinamicamente nel corso dell'evoluzione delle piante. La recente evoluzione degli omologhi *FT* ha portato loro all'acquisizione della funzione di repressore, in più specie. La ricerca attuale sta gradualmente rivelando i meccanismi molecolari dell'azione dei geni *FT* e *TFL1* e sta scoprendo il significato delle proteine interagenti tra *FT* e *TFL1* nel controllo delle loro funzioni opposte. La fiorente conoscenza della famiglia genetica *FT / TFL1*, consentirà la modifica dell'azione di florigena e anti-florigena nel prossimo futuro, promuovendo così

l'adattamento delle piante ad un mondo con climi mutevoli e rapida crescita della popolazione (Wickland *et al.*, 2015).

1.3 Organismi geneticamente modificati

Un organismo geneticamente modificato (OGM), è definito, dalla direttiva europea 2001/18, "un organismo il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o ricombinazione genetica naturale". Questo viene ottenuto mediante tecniche di trasformazione genetica, diretta o indiretta, le quali hanno l'obiettivo di trasferire, inserire e integrare, nel genoma dell'ospite, uno o più geni, di interesse, di un organismo di una specie differente. Gli organismi geneticamente modificati, o meglio transgenici, possono contenere geni provenienti da organismi donatori (batteri, piante o animali) anche geneticamente molto distanti dall'organismo ospite, perché con le tecniche di trasformazione genetica è possibile aggirare le barriere di incompatibilità sessuale, tra specie differenti. Queste tecniche di trasformazione consentono di introdurre nuovi geni nel patrimonio genetico dei vegetali o di sopprimere l'espressione di geni in esso presenti. Attraverso la trasformazione genetica è possibile ottenere piante resistenti a fattori di stress biotici (virus, batteri, insetti funghi) e abiotici (fattori ambientali), aumentare le proprietà nutraceutiche dei frutti, svincolare le specie dal fotoperiodo e dal termoperiodo, indurre la maschiosterilità e/o la partenocarpia, modificare colore forma e composizione dei frutti, modificare l'habitus e la fenologia delle specie. Le piante transgeniche sono utilizzate anche in settori diversi da quello alimentare; possono essere impiegate per l'eliminazione dei rifiuti tossici dall'ambiente e la bonifica del suolo (*phytoremediation*) (Benoit Van Aken, 2008); inoltre gli OGM sono utilizzati per la produzione di enzimi ad uso industriale e in campo biomedico per produrre vaccini, antibiotici e anticorpi (Jianfeng Xu *et al.*, 2011). Nel mondo sono diffuse diverse varietà di piante geneticamente modificate (PGM). Tra le specie erbacee le più diffuse sono soia, mais e cotone, con una superficie, rispettivamente, di 92, 54 e 23 milioni di ettari (ISAAA, 2015); mentre tra le arboree sono coltivate la papaya (*Carica papaya* L.) resistente al Papaya ringspot virus (PRSV) (Fitch *et al.*, 1992) e una cultivar di susino resistenti al virus della Sharka (Honeysweet) (Scorza *et al.*, 2013). A livello

mondiale gli OGM sono coltivati in 28 Paesi e la superficie ad essi dedicata è passata dagli 1,7 milioni di ettari nel 1996 a 179,7 milioni di ettari nel 2015 (ISAAA, 2015).

1.3.1 Biotecnologie genetiche applicate alla fragola

Le colture di fragola si possono considerare d'elevata importanza per la loro adattabilità a diversi tipi di suoli, condizioni climatiche e per la loro elevata richiesta da parte del consumatore, sia come prodotto fresco, sia come prodotto trasformato (Mezzetti, 2003). Il miglioramento genetico tradizionale è spesso ostacolato da numerosi aspetti connessi alle caratteristiche biologiche, in molte specie perenni, tra le quali il lungo ciclo riproduttivo, la prolungata fase giovanile, l'elevata eterozigosi e la complessa biologia fiorale, che rendono lungo e difficile l'ottenimento di caratteri specifici, che soddisfino gli obiettivi dei programmi di miglioramento genetico, con incroci e selezioni. Con la trasformazione genetica possiamo superare tali limiti (Mezzetti e Gentile *et al.*, 2005). Ecco quindi che l'integrazione dei tradizionali programmi di miglioramento genetico alle avanzate tecniche biotecnologiche, offrono interessanti prospettive nel migliorare l'adattabilità, l'efficienza della produzione e la qualità dei frutti di queste piante (Mezzetti *et al.*, 2004). Inoltre nella trasformazione genetica è possibile superare le incompatibilità che ci possono essere tra specie di piante diverse e tra organismi completamente diversi, usando per esempio geni provenienti da batteri o da animali. La fragola coltivata, tra i piccoli frutti, è senz'altro la coltura di maggior interesse per tutto il mondo. Vi sono stati numerosi studi riguardo la specie *Fragaria x ananassa*; questa è stata utilizzata, in sperimentazioni, per la determinazione e la clonazione di più di 100 geni, per lo studio delle resistenze genetiche e la loro conseguente mappatura genomica e anche in processi di trasformazione genetica. I geni studiati di questa specie sono coinvolti in diversi processi quali, la maturazione del frutto, la fioritura, il metabolismo cellulare. In seguito a lavori su colture in vitro negli anni '70 e '80, sono stati messi a punto, con successo, protocolli di trasformazione in relazione a diversi genotipi. Non solo sono importanti i protocolli di trasformazione ma anche quelli che prevedono la rigenerazione dei tessuti trasformati, in modo da ottenere una pianta intera. I geni maggiormente impiegati, nei programmi di trasformazione genetica, controllano

caratteri come la partenocarpia, la resistenza a stress biotici, l'habitus della pianta e la resistenza agli erbicidi (Mezzetti *et al.*, 2004).

1.3.2 Trasformazione genetica

Sono disponibili diverse tecniche di trasformazione genetica delle piante; la più utilizzata (adottata anche in questo lavoro di tesi) è la tecnica di trasformazione genetica indiretta, mediata da *Agrobacterium tumefaciens*. Questo è l'agente eziologico del tumore batterico delle piante, è un batterio gram-negativo che in natura infetta le piante causando la formazione di una galla o tumore del colletto, in seguito al trasferimento di una breve sequenza di DNA plasmidico (T-DNA) nel genoma della pianta infettata (Chilton *et al.*, 1977). I ceppi virulenti naturali del batterio contengono un plasmide extracromosomico chiamato Ti (*Tumor-inducing*); questo, è un vettore di trasferimento e integrazione delle sequenze codificanti l'induzione di iperplasie e neoplasie a livello dei tessuti, nel genoma della pianta. Il frammento di materiale genetico trasferito (T-DNA) contiene tre geni che producono enzimi coinvolti nella biosintesi di ormoni vegetali, ed è quindi l'aumento di produzione di tali ormoni a generare il tumore. Questo vettore Ti presente in natura, è alla base della tecnica di trasformazione genetica più diffusa in quanto, da esso sono derivati numerosi vettori di trasformazione per le piante.

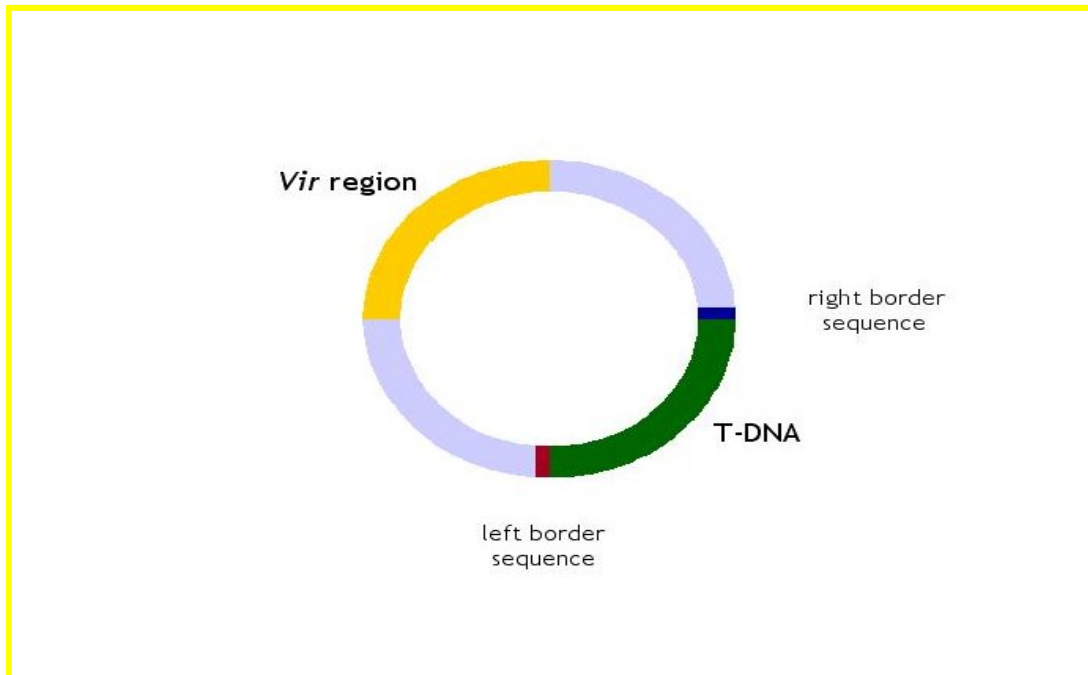


Figura 3: Rappresentazione grafica del Plasmide Ti di *Agrobacterium tumefaciens*.

Il plasmide Ti, per essere impiegato nei diversi protocolli di trasformazione, necessita di essere disarmato della porzione responsabile di virulenza, compresa tra i bordi sinistro (LB) e destro (RB), e armato con un costrutto genico, contenente i geni di interesse, da trasferire nella pianta. Il nuovo T-DNA così creato non provocherà l'induzione di malformazioni sulla pianta e per questo viene detto disarmato. Per il trasferimento del T-DNA in una cellula vegetale, è necessaria l'esposizione delle membrane cellulari all'attacco del batterio, attuata mediante la lesione dei tessuti, in ambiente sterile. L'adesione del batterio alla membrana plasmatica coinvolge geni presenti nel genoma batterico. Nel plasmide Ti (circa 200 kb) hanno sede 35 geni *Vir* (virulenza) che partecipano al processo infettivo (Gelvin e S. B. 2006). In una cellula possono integrarsi una o poche copie del T-DNA. Il sito del genoma in cui avviene l'integrazione, è apparentemente casuale (Lorenzetti *et al.*, 2011). Nuovi ceppi batterici contengono un maggior numero di geni *VirG* che sembrano indurre maggiore virulenza e aumentare quindi, l'efficienza di trasformazione. La virulenza dell'*Agrobacterium* dipende sia dal ceppo, sia dalle condizioni e dal periodo di co-coltura con il tessuto utilizzato per la trasformazione. L'espressione dei geni *Vir*, responsabili dell'efficacia del trasferimento del T-DNA, può essere alterata dal pH,

dalla temperatura e dalle condizioni osmotiche del substrato di co-coltura (Sansavini *et al.*, 2014). Nel substrato di co-coltura vengono aggiunte sostanze fenoliche, come l'acetosiringone, che mimano il rilascio di fenoli da parte dei tessuti vegetali feriti e stimolano quindi la trascrizione dei geni *Vir*, aumentando le probabilità di infezione e di conseguenza, l'efficacia dell'intero processo di trasformazione. Prolungando il tempo di co-coltura tra il batterio e i tessuti da trasformare, potrebbe aumentare l'efficienza di trasformazione ma, allo stesso tempo vi è un maggior rischio di contaminazione dei tessuti da parte del batterio, difficile da controllare nella successiva fase di selezione e rigenerazione. Il successo di trasformazione dipende soprattutto dalla disponibilità di un protocollo genotipo-specifico per la rigenerazione, da tessuti somatici, quali lamine fogliari o internodi di germogli cresciuti in vitro. In fragola è stato riportato che genotipi con efficienze di rigenerazione da tessuti fogliari superiori al 90% ed elevato numero di rigenerazioni per tessuto fogliare, sono in grado di garantire risultati di trasformazione ripetibili e con frequenze accettabili, vicino all'1%. Efficienze di rigenerazione inferiori al 60% non danno praticamente cloni trasformati (Sansavini *et al.*, 2014).

1.3.3 Geni marcatori di selezione e geni reporter

Nel processo di trasformazione genetica mediata da Agrobatterio, l'efficienza di trasformazione risulta essere bassa, infatti solo una minima percentuale delle cellule trattate avrà subito l'evento di trasformazione. Nella successiva fase di selezione e rigenerazione, vengono selezionati solamente gli espianti che presentano un'integrazione stabile del transgene. Questi, vengono selezionati tramite il gene marcatore di selezione (GMS), presente spesso all'interno del costrutto genico insieme al gene di interesse agronomico. Il GMS codifica spesso per l'espressione del carattere di resistenza ad un antibiotico che, offre all'ospite trasformato, un vantaggio selettivo rispetto agli espianti non trasformati, i quali non sopravvivono alla fase di selezione con antibiotico. Il GMS più utilizzato è il gene della *neomicina fosfotransferasi II* (*NPTII*) che codifica per la resistenza alla kanamicina. Come marcatori vengono utilizzati anche geni di resistenza a erbicidi, come l'igromicina fosfotransferasi (*hpt*), gene per la resistenza ad igromicina, e fosfinotricina acetiltransferasi (*pat*) che conferisce resistenza all'erbicida fosfinotricina (o glufosinato). Per ottimizzare il

processo di selezione, oltre ai geni di resistenza (*NPTII*), vengono introdotti all'interno del costrutto i geni reporter; questi evidenziano la presenza di eventi di trasformazione attraverso saggi o rilievi visivi. I geni reporter più conosciuti sono il gene *Uida* (rilevato tramite saggio GUS) e il gene che codifica per la *green fluorescent protein* (*GFP*). I saggi GUS sono basati sull'enzima di *Escherichia coli*, beta-glucuronidasi; questo enzima, fornito di specifici substrati incolori e non fluorescenti (non endogeni), è in grado di renderli colorati, dunque visibili all'operatore. I rilievi visivi sulla GFP invece, sono basati sull'emissione di fluorescenza, da parte degli espianti trasformati, sotto raggi UV o luce blu, senza l'utilizzo di substrati specifici o co-fattori. Questo è possibile perché il gene *GFP* codifica per la produzione della *green fluorescent protein* (*GFP*), proteina che possiede la capacità unica di emettere fluorescenza (luce verde) quando eccitata da luce UV; il gene è stato clonato e sequenziato nei primi anni '90 dalla medusa *Aequorea victoria*.

1.3.4 Promotore e terminatore

La riuscita del processo di integrazione del T-DNA all'interno del genoma della pianta, è determinato da sequenze di regolazione utili a far riconoscere come proprio, il gene d'interesse e a consentirne l'espressione. Ogni gene, infatti, non è esprimibile se non è accompagnato da una corta sequenza genetica all'estremità iniziale, detta promotore; questa sequenza consente l'espressione delle proteine nelle quantità, nei tempi e nei luoghi corretti e normalmente è diverso per ogni gene. È per questo che il transgene deve contenere anche l'interruttore genetico in grado di attivarlo propriamente (Lazzerini *et al.*, 2001). Il promotore è detto costitutivo se induce la trascrizione del gene, a ritmo elevato, in tutti i tessuti dell'organismo; il promotore 35S del virus del mosaico del cavolfiore (CaMV35S) è un promotore costitutivo. Altri promotori consentono la trascrizione del gene solamente in determinati organi o tessuti, come quelli delle gluteline dei cereali o della napina nella colza che permettono l'espressione del gene solo nel seme; questi vengono definiti promotori specifici. In coda al gene da trasferire è inserito il terminatore, una sequenza nucleotidica che ha lo scopo di arrestare la trascrizione; uno dei terminatori più usati nelle piante è quello del gene *nopalina sintasi* (*nos*) di *Agrobacterium tumefaciens*.

1.3.5 Le nuove biotecnologie per la trasformazione genetica

Il miglioramento genetico delle specie arboree perenni, mediante tecniche di breeding tradizionali, presentano numerosi limiti, principalmente causati dal loro alto grado di eterozigosi, dalla lunghezza della fase giovanile e dall'autoincompatibilità. Lo sviluppo di nuovi strumenti biotecnologici (NBT), come l'RNA interference (RNAi), la cisgenesi / intragenesi e gli strumenti di modifica del genoma, come CRISPR / Cas9, hanno introdotto l'utilizzo di tecniche genetiche più precise e veloci per la trasformazione delle piante. Questo aspetto è di particolare importanza per l'introduzione o la modifica di tratti specifici nelle specie coltivate (soprattutto perenni), pur mantenendo inalterate le caratteristiche generali di una cultivar selezionata. Inoltre, alcuni di questi nuovi strumenti offrono la possibilità di ottenere genomi modificati privi di transgeni, il che dovrebbe migliorare l'accettazione pubblica degli organismi geneticamente modificati. Nel corso degli anni gli strumenti biotecnologici hanno subito un rapido sviluppo con la continua introduzione di nuove tecniche per la trasformazione genetica delle piante. Ciò consente di creare varietà di interesse agronomico, in modo rapido ed efficiente. Le nuove biotecnologie, utilizzate per modificare una sequenza di DNA esistente, in una pianta, comprendono l'inserimento/eliminazione e la sostituzione genica o il silenziamento stabile di una sequenza genica o promotore (Limera *et al.*, 2017).

1.3.6 Cisgenesi e intragenesi

Il termine cisgenesi è stato introdotto da Schouten *et al.*, (2006), definendolo come la modificazione genetica delle piante attraverso geni che provengono solo dalla specie stessa o da una specie che può essere incrociata convenzionalmente con questa specie. Il gene aggiunto è una copia in più del genoma esistente ed è una variante naturale, che include i suoi introni, promotore nativo e terminatore, orientati in senso normale (Lusser e Davies, 2013). Nell'intragenesi, l'elemento genetico introdotto (intragene) proviene dalla stessa specie o una specie da un pool genico sessualmente compatibile. Gli intrageni sono considerati geni ibridi poiché possono essere guidati da diverse regioni di promotori o terminatori di diversi geni e loci (Rommens *et al.*, 2007). La sequenza di DNA inserita formerà una nuova disposizione di elementi genetici che porterà a una versione funzionale modificata rispetto al genoma iniziale (Conner *et al.*,

2007). Inoltre, nelle piante intrageniche, quando si utilizza la trasformazione mediata da *Agrobacterium*, come strategia per inserire il nuovo tratto, vengono utilizzate sequenze per il trasferimento del DNA di origine vegetale (P-DNA) da pool di DNA sessualmente compatibile, al fine di evitare l'inserimento accidentale di sequenze del vettore (Rommens *et al.*, 2004). Pertanto, è possibile ottenere piante trasformate che non contengono DNA estraneo. Questi approcci evitano il potenziale di "linkage drag" (il trasferimento di geni indesiderati insieme al gene di interesse), associato all'introggressione classica nell'allevamento convenzionale (Jacobsen e Schouten, 2007). Interi studi di sequenziamento genomico, di specie coltivate, stanno fornendo informazioni sui cisgeni che possono essere utilizzati per il miglioramento genetico di colture specifiche, ma in molti casi la disponibilità di promotori cisgenici e geni marcatori efficienti sono limitate. Le tecniche di cisgenesi / intragenesi sono state applicate su diverse specie da frutto, tra cui il melo, per ottenere piante resistenti ai principali patogeni, come *Erwinia amylovora* (colpo di fuoco batterico). Kost *et al.*, (2015) ha recentemente sviluppato una linea di melo cisgenico C44.4.146 da una cultivar sensibile al colpo di fuoco batterico "Gala Galaxy" usando il cisgene FB_MR5 della mela selvatica *Malus x robusta* 5 (Mr5), che conferisce resistenza alla peronospora (Peil *et al.*, 2007).

1.3.7 RNA interference (RNAi)

La scoperta del fenomeno del silenziamento genico, nelle piante, è avvenuta nel 1990, da scienziati che hanno cercato di approfondire il colore viola delle petunie, attraverso la sovraespressione del gene di *Chalcone sintasi*. Contrariamente alle loro aspettative, i fiori sono diventati bianchi indicando che il gene era stato disattivato (Napoli *et al.*, 1990; Metzlauff *et al.*, 1997). La soppressione dell'espressione genica endogena, nella petunia, attraverso l'introduzione di una sequenza omologa nel genoma è stata definita "co-soppressione" (Campbell e Choy, 2005), successivamente correlata al fenomeno del silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS). L'RNAi è un processo cellulare endogeno che si verifica naturalmente per "spegnere" sequenze nucleiche specifiche indesiderate o dannose o per regolare l'espressione genica, prima della traduzione (Baum *et al.*, 2007; De Alba *et al.*, 2013). L'RNAi è stato scoperto e studiato in molti

organismi come funghi, animali e i ciliati (Romanoand e Macino, 1992; Fire *et al.*, 1998; Billmyre *et al.*, 2013; Scott *et al.*, 2013), e più recentemente è stato studiato nelle piante (Matzke *et al.*, 2001; Baulcombe *et al.*, 2004; Ipsaro e Joshua-Tor, 2015). L'RNAi si riferisce a un complesso di meccanismi molecolari, che hanno la funzione principale di inibizione o soppressione dell'espressione genica, attivati dalla presenza di molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA; Voinnet *et al.*, 2008; Parent e Vaucheret, 2012). La scoperta di questo processo ha portato alla possibilità di dare luogo ad "abbattimenti" personalizzati dell'attività genetica. Sia nelle piante che negli animali è stato dimostrato che RNAi utilizza i dsRNA come molecole trigger che rilevano mRNA omologhi, la cui trascrizione è regolata negativamente (Almeida e Allshire, 2005; Ketting *et al.*, 2011; Ipsaro e Joshua-Tor, 2015). Di conseguenza, il silenziamento dell'RNA è emerso come metodo preferito per il targeting genico nei funghi (Salame *et al.*, 2011), insetti (Scott *et al.*, 2013), batteri (Escobar *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006), virus (Baulcombe *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2010) e piante (Brodersen e Voinnet, 2006; Frizzi e Huang, 2010).

1.3.8 CRISPR-Cas9

Dieci anni fa è emerso un nuovo approccio che ha consentito ai ricercatori di manipolare quasi tutti i geni, in diversi tipi di cellule e organismi. Questa tecnica fondamentale, comunemente denominata "modifica del genoma", integra, elimina e/o muta i geni di interesse. Le nucleasi ingegnerizzate composte da sequenze specifiche di DNA collegate a moduli di scissione del DNA, non specifici, sono al centro delle tecniche di modifica del genoma (Urnov *et al.*, 2010). Le nucleasi ingegnerizzate sono state progettate come strumenti per l'editing del genoma, sono tecniche di ingegneria genetica efficienti per colpire e scindere sequenze di DNA, in posizioni specifiche del genoma di piante e animali (Bortesi e Fischer, 2015; Osakabe e Osakabe, 2015). I sistemi CRISPR / Cas9 sono parte integrante del sistema immunitario, adattivo di batteri (*Streptococcus pyogenes*) e archaea (Bhaya *et al.*, 2011; Jinek *et al.*, 2012; Barrangou *et al.*, 2015; Bortesi e Fischer, 2015), che li protegge dall'invasione di acidi nucleici come i virus. Questa immunità adattativa viene fornita attraverso il silenziamento degli acidi nucleici invasori, utilizzando gli RNA CRISPR (crRNA) e le nucleasi Cas9 (Horvath e Barrangou, 2010). Si è scoperto che il gene *Cas9*, nei

genomi batterici, è strettamente collegato a brevi sequenze altamente omologhe disposte in ripetizioni, in tandem, con dimensioni variabili tra 21 e 37 bp, intervallate da sequenze spaziali non omologhe (Jansen *et al.*, 2002; Bhaya *et al.*, 2011). L'immunità viene acquisita integrando nel genoma brevi frammenti di DNA dall'organismo invasore (distanziatori), tra due ripetizioni adiacenti alle estremità prossimale di un locus CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Bortesi e Fischer, 2015). Le sequenze del distanziatore determinano il bersaglio da tagliare dall'endonucleasi. Gli array CRISPR, che includono i distanziatori, vengono trascritti durante ogni incontro con il DNA del vettore e trasformati in piccoli RNA CRISPR (crRNA) lunghi 40 bp, che si combinano con l'RNA CRISPR trans-attivante (tracrRNA) per attivare e guidare la nucleasi Cas9 nella scissione dell'acido nucleico del vettore (Bortesi e Fischer, 2015). Il riconoscimento del target, dipende dal PAM (protospacer adjacent motif) che è a valle della sequenza target e di solito ha la sequenza 5'-NGG-3' adiacente all'estremità 3' del target, lungo 20bp (Jinek *et al.*, 2012; Bortesi e Fischer, 2015). L'applicazione di questo sistema immunitario naturale, all'editing del genoma vegetale, richiede la creazione di una singola molecola di RNA guida (sgRNA), ottenuta dalla fusione dell'estremità 3' dell'RNA e 5' dell'estremità del tracrRNA. In questo modo Cas9 viene riprogrammato

per indurre la scissione di specifiche sequenze di DNA (Figura 4).

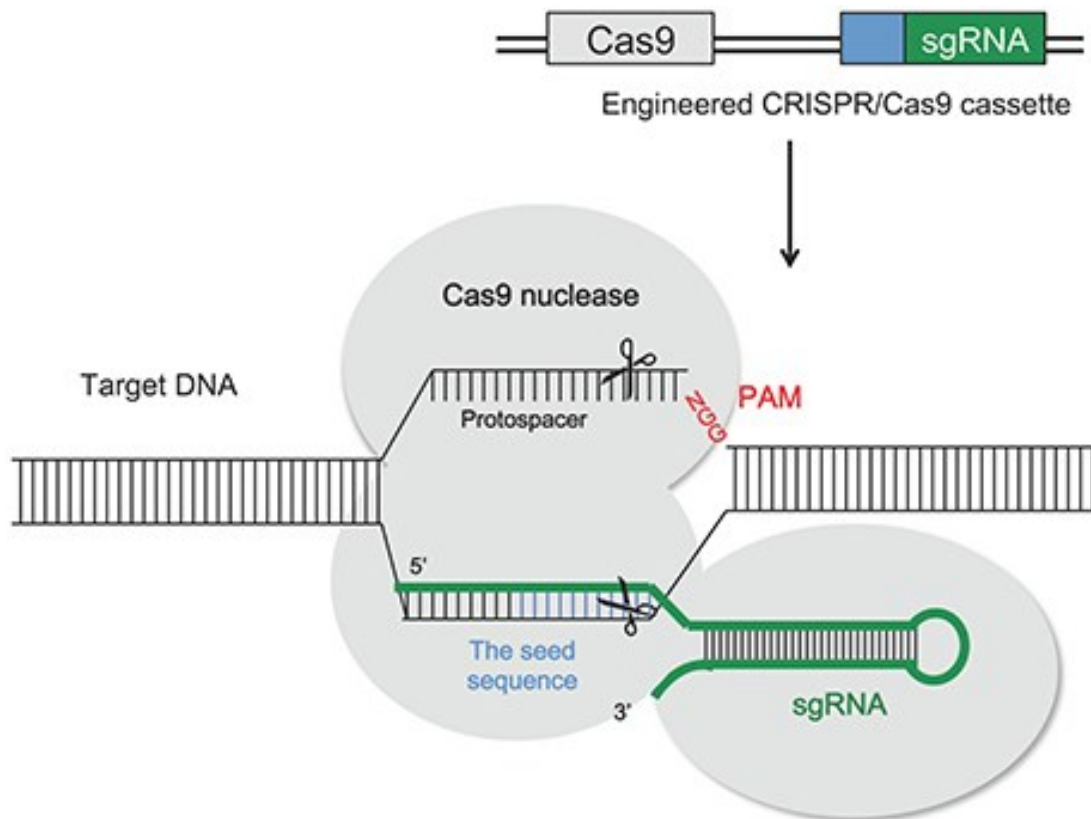


Figura 4: Illustrazione schematica della struttura del sistema CRISPR / Cas9 e del principio delle modificazioni genomiche mediate da CRISPR / Cas9. Cas9 può essere riprogrammato per indurre la scissione di specifiche sequenze di DNA mediante la produzione di un RNA guida sintetico (sgRNA). Contiene una regione (seed sequence, generalmente lunga 8-12 bp, mostrata in blu) complementare al DNA target, sui loci genomici che media il legame della proteina Cas9. Il sito di scissione rimane 3 bp a monte del PAM (NGG; mostrato in rosso), necessario per la scissione della sequenza di DNA bersaglio. I DSB indotti del DNA bersaglio sono riparati da NHEJ o HDR, producendo mutazioni geniche che includono l'inserzione, la delezione o la sostituzione dei nucleotidi attorno ai siti di scissione (Limera et al., 2017).

Il sistema CRISPR / Cas9 è stato ampiamente utilizzato per la sua semplicità, flessibilità di progettazione e alta efficienza, che lo ha reso facilmente applicabile nei laboratori. È anche il meno costoso e più intuitivo dei tre strumenti di modifica del genoma (Nagamangala et al., 2015). Il sistema CRISPR / Cas9 è stato applicato in numerose specie da frutto. Questa tecnica di modifica del genoma è stata applicata, ad esempio, per aumentare la resistenza contro il cancro degli agrumi, causata da *Xanthomonas citri subsp. citri* (Xcc), una malattia mortale che minaccia l'industria degli agrumi in tutto il mondo (Stover et al., 2014)

1.4 Rigenerazione da tessuti somatici

La riuscita del protocollo di trasformazione genetica, è determinata soprattutto dall'efficienza del protocollo di rigenerazione in vitro. Come abbiamo detto, per ottenere piante geneticamente modificate, oltre alla tecnica di trasformazione, è necessario lo sviluppo di un efficiente protocollo di rigenerazione, a partire da tessuti somatici, preferibili per la trasformazione genetica delle specie da frutto. Una condizione necessaria per la modificazione genetica di varietà di fragola commerciali, è un sistema di rigenerazione efficiente (James *et al.*, 1988) che fornirà poi, il mezzo per il recupero di piante geneticamente modificate, in seguito al trattamento di espianti con *Agrobacterium* o bombardamento con particelle. I vari protocolli di rigenerazione da tessuti somatici, sono genotipo-specifici perciò, può essere utile avere una conoscenza di base del background genetico e il suo effetto sulla rigenerazione. Sarebbe interessante eventualmente, mediante l'uso di marcatori di DNA, determinare le basi genetiche della recalcitranza alla rigenerazione (Passey *et al.*, 2003). La rigenerazione di germogli avventizi da tessuti somatici, è stata dimostrata anche in fragola coltivata (*Fragaria x ananassa* Duch.). L'organogenesi di germogli avventizi può essere ottenuta da tutti gli organi vegetali della pianta purché, vitali come espianti fogliari, piccioli, stipule, tessuti dello stelo, stoloni, protoplasti del mesofillo, coltura di antere, radici ed embrioni immaturi. La rigenerazione di germogli da tessuto fogliare, è stata principalmente correlata al genotipo e alla composizione del substrato (PGR e tipo di substrato nutritivo). Anche i fotocicli influenzano le risposte di rigenerazione dei tessuti tuttavia, gli effetti reali possono differire a seconda delle interazioni genotipo-PGR. In ogni caso, il fattore principale che interessa l'efficienza di rigenerazione è il genotipo. Varietà di fragola coltivate, hanno dimostrato grande variabilità nella capacità di differenziazione dei loro tessuti somatici e gli effetti dei trattamenti con PGR per l'induzione di questo processo, sembrano essere correlati a fattori genetici specifici (Passey *et al.*, 2003). I substrati di rigenerazione che sono stati generalmente impiegati per produrre la massima rigenerazione di germogli, sono composti da Murashige e Skoog (1962) (MS) e integrati con 6-benzilaminopurina (BA) e acido indol-3-butirrico (IBA) (Barcelò *et al.*, 1998; Passey *et al.*, 2003). In particolare, è stata segnalata la capacità di 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il) urea

(thidiazuron; TDZ) di provocare un'alta efficienza di rigenerazione in tessuti vegetali di specie legnose (Landi e Mezzetti, 2006). In fragola, l'effetto di TDZ è stato approfondito recentemente in un numero limitato di cultivar di *Fragaria x ananassa*. Questo PGR simile alle citochinine, ha mostrato risposte specifiche in base al genotipo e al tipo di tessuto impiegato (Landi e Mezzetti, 2006; Cappelletti *et al.*, 2015). L'equilibrio ormonale è un altro fattore chiave nella regolazione della morfogenesi in espianti coltivati. Le interazioni tra le auxine e le citochinine, durante lo sviluppo delle piante, sono complesse e l'equilibrio tra i due regolatori di crescita, controlla la formazione di radici, germogli e callo meristemato, in vitro, e la fuoriuscita di germogli avventizi (Landi e Mezzetti; 2006). L'organogenesi si basa sulla plasticità intrinseca dei tessuti vegetali, ed è regolata alterando i componenti del terreno. È noto che per indurre la formazione di germogli si deve aumentare il rapporto citochinine-auxine del terreno di coltura. Il Thidiazuron (TDZ), con i suoi effetti citochinine simili, è stato utilizzato come sostituto per fenilurea (Nphenyl- N'-1,2,3thidiazol- 5-ylurea) ed è ora tra le sostanze citochinine-simili più attive per colture di tessuti vegetali e viene ampiamente usato per indurre formazione di germogli in fragola. L'uso di TDZ da solo o in combinazione con acido 2,4-diclorofenossiacetico (2,4-D) o IBA (acido indolbutirrico) è stato riscontrato essere efficace nella rigenerazione in vitro da porzioni di foglia di fragola (Zakaria *et al.*, 2014). L'incubazione al buio è ben nota per risolvere il problema dell'imbrunimento della superficie degli espianti dei tessuti vegetali di fragola allevati in vitro. L'imbrunimento è prodotto dall'ossidazione dei composti fenolici che producono i chinoni, i quali reagiscono con i tessuti vegetali portandoli alla necrosi. Pertanto, l'incubazione al buio è consigliata per ridurre la necrosi degli espianti, inibendo l'attività enzimatica, responsabile dell'ossidazione dei tessuti. In fragola, l'incubazione al buio di espianti fogliari per almeno una settimana è necessaria per migliorare l'organogenesi (Zakaria *et al.*, 2014).

2. SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro sperimentale, è nato grazie alla collaborazione di ricercatori, professori e tesisti dell'area di frutticoltura e arboricoltura del D3A-UNIVPM e del gruppo della dott.ssa Denoyes dell'INRA di Bordeaux (FR) che, dopo diversi anni di sperimentazione, hanno ottenuto piante di fragola (*Fragaria x ananassa Duch.*), cv. Sveva, modificate geneticamente con 2 geni di interesse che, si pensava avessero un ruolo nell'induzione a fiore. Questi geni sono denominati *FT1* e *FT2* (*FLOWERING LOCUS T1* e *T2*).

Il lavoro di tesi si articola in diverse sperimentazioni: la prima ha riguardato la caratterizzazione fenotipica di piante, della cv. Sveva, trasformate geneticamente con i due geni d'interesse sopra citati. In particolare, sono stati acquisiti i dati sull'architettura della pianta attraverso dei rilievi biometrici di 4 linee, esponenti il gene *FT1* e di 3 linee trasformate con il gene *FT2*, a confronto con i rispettivi controlli non trasformati (Wild Type).

La seconda sperimentazione, si è focalizzata sull'ottimizzazione di un protocollo di rigenerazione e trasformazione genica, mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, a partire da tessuti somatici della cv. Romina (*Fragaria x ananassa Duch.*) (così come Sveva ottenuta dal programma di miglioramento genetico fragola del D3A-UNIVPM), per validare il gene *FT1* in una varietà unifera con differente habitus e ciclo di fioritura rispetto alla cv. Sveva.

Nella terza sperimentazione è stata studiata la segregazione del gene *FT1* e l'espressione fenotipica della prima generazione di semenzali, derivanti da incrocio controllato tra la cv. Rociera e le linee trasformate FT1A, FT1B e FT1D della cv. Sveva. In particolare, è stata osservata la prematura presenza di fiori sui semenzali e l'espressione o meno, del gene reporter *green fluorescent protein (GFP)* presente nel costrutto genico di interesse.

3. MATERIALI E METODI

3.1 SPERIMENTAZIONE 1: validazione dei geni *FT1* e *FT2* mediante caratterizzazione fenotipica di linee transgeniche della cv. Sveva

3.1.1 Materiale vegetale

In questa prima prova, sono state messe a confronto quattro linee transgeniche di piante di fragola appartenenti alla cv. Sveva, a confronto con due linee di controllo Wild type ed una “Escape”, della medesima cultivar. La linea “Escape”, deriva da un germoglio rigenerato durante la prova di trasformazione, resistente alla selezione con kanamicina (antibiotico), il quale non presenta l’espressione del transgene. Il materiale studiato era posto all’interno della screen house, dell’Università Politecnica delle Marche, secondo le norme europee che regolamentano la sperimentazione sugli OGM. Le piante, cloni delle diverse linee transgeniche e dei controlli, erano messe a dimora in vasi tondi (18 cm di diametro), riempiti con torba (miscela di torba nera e torba bianca di *Substrate 2, Klasmann-Deilmann GmbH*) e tutti concimati con la stessa quantità di concime NPK (20-20.20), a lenta cessione. Sveva è una cv. unifera a maturazione tardiva o molto tardiva, adatta agli ambienti della fascia centro-settentrionale dell’emisfero nord. La pianta presenta elevata rusticità, elevata vigoria, elevata produttività, un buon accostamento ed una buona adattabilità a terreni non fumigati e di tipo argilloso e calcareo.

Le quattro linee transgeniche (FT1 A, FT1 B, FT1 C, FT1 D) derivano da un precedente lavoro di tesi. Le piante sono state modificate geneticamente per l’espressione del gene *FT1* a livello costitutivo, attraverso il costrutto genico 35S-FT1-GFP-NPTII. Le quattro linee trasformate, sono state fatte proliferare in vitro e in seguito ambientate. In questo lavoro di tesi sono state caratterizzate 7 piante per linea, insieme alle linee di controllo Wild Type e “Escape”. Le piante delle linee suddette e dei rispettivi controlli (Wild Type e Escape), su cui sono stati effettuati i rilievi biometrici, costituiscono la prima generazione agamica da micropropagazione.

Le restanti tre linee transgeniche, denominate F1G1, F3G1, F3G2, appartengono alla stessa cv. Sveva e sono modificate geneticamente per l'espressione del gene *FT2*, a livello costitutivo, utilizzando il costrutto genico 35S-FT2-GFP-NPTII. La trasformazione genetica è stata fatta da un precedente lavoro di ricerca. Le tre linee transgeniche, più una non trasformata (controllo, Wild Type), sono state propagate in vitro e ambientate. In questo lavoro di tesi sono state caratterizzate fenotipicamente 15 piante per linea, corrispondenti alla terza e seconda generazione agamica, derivanti da propagazione per stolone, rispettivamente per le linee transgeniche e il controllo non trasformato.

3.1.2 Metodo di valutazione dell'espressione fenotipica

I rilievi sono stati effettuati su piante adulte in screen-house, nei mesi di maggio, giugno, luglio e ottobre, facendo le misurazioni una volta al mese a distanza di 30 giorni. Per le linee FT1 è stato possibile effettuare un solo rilievo, nel mese di maggio, perché tutte le piante sono state distrutte da *Tetranychus urticae* (ragno rosso), acaro polifago, fitofago di molti ortaggi e della fragola coltivata. Durante i rilievi le misurazioni sono state effettuate tutte dallo stesso operatore e con lo stesso strumento metrico standard, un righello, in modo da ridurre al minimo gli errori di misurazione. Durante la prima raccolta dati, le piante si trovavano all'apice dello sviluppo vegetativo, a ridosso della fase di fioritura. I rilievi biometrici effettuati sono:

- **altezza pianta:** il punto di riferimento inferiore, per i rilievi, è stato preso a livello della corona e il punto di riferimento superiore all'apice della foglia più alta e sviluppata;
- **altezza picciolo:** come riferimento inferiore, per la misurazione è stata presa l'attaccatura a livello della corona e come riferimento superiore il punto in cui si inserisce la foglia palmata;
- **altezza fogliolina centrale:** i punti di riferimento presi sono l'attaccatura della foglia e il suo apice, a livello della nervatura principale;
- **larghezza fogliolina centrale:** come riferimento sono stati considerati gli estremi laterali della foglia, dove questa raggiungeva la massima ampiezza;

- **numero foglie:** il conteggio è stato effettuato manualmente escludendo quelle appena germogliate, avendo queste dimensioni trascurabili e non essendo totalmente aperte;
- **numero infiorescenze:** il conteggio delle infiorescenze è avvenuto manualmente, dove erano presenti;
- **numero stoloni:** il conteggio degli stoloni è avvenuto manualmente, dove erano presenti;
- **numero di germogli (solo per le linee FT1):** il conteggio dei germogli, per pianta, è stato fatto visivamente, andando ad osservare a ridosso della corona;
- **numero di fiori (solo per le linee FT1):** il conteggio è stato effettuato visivamente, includendo solo i fiori sviluppati e vitali;
- **numero di frutti maturi (solo per le linee FT1):** il conteggio dei frutti maturi è stato effettuato visivamente a partire dalla stagione vegetativa, in quanto su alcune linee erano già presenti.

3.1.3 Analisi statistica

Durante i rilievi, per i parametri biometrici (altezza del picciolo, altezza e larghezza delle foglie centrali), sono state effettuate tre misurazioni su tre diverse foglioline per ogni pianta. Le tre foglioline prese in considerazione appartengono alle prime tre foglie centrali, più alte, più grandi e meglio sviluppate. Tutti i dati sono stati riportati su un foglio di lavoro Excel, aggiornati periodicamente; a seguito, è stata effettuata un'analisi statistica dei dati, mediante analisi della varianza a una via (ANOVA), e per valutare eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$), è stato usato il test di Newman-Keul (test POST-HOC).

3.2 SPERIMENTAZIONE 2: ottimizzazione di un protocollo di trasformazione genica, mediato da *A.tumefaciens*, della cv. Romina per la validazione del gene *FT1*

Durante la sperimentazione tutte le operazioni descritte sono state effettuate in ambiente sterile, sotto cappa a flusso laminare orizzontale, in modo da ridurre i rischi di contaminazione del materiale vegetale.

3.2.1 Materiale vegetale

Come espianto iniziale, per la prova di trasformazione, sono state utilizzate foglie giovani e con la lamina espansa, derivanti da piante di fragola della cv. Romina; precedentemente poste su un substrato di allungamento in vitro per 4 settimane, denominato MS0 (4.4 g/L di sali MS con vitamine, 30 g/L di zucchero, 7.5 g/L di plant agar). In totale dalle piante in allungamento sono state prelevate 210 foglie (espanti).

3.2.2 Soluzioni stock

Per le sperimentazioni è stato necessario preparare soluzioni, pronte all'uso, con la giusta concentrazione, di ormoni (regolatori di crescita) e antibiotici (utilizzati nella selezione), da utilizzare nelle diverse fasi del protocollo di trasformazione. Le soluzioni stock sono le seguenti:

- Ormoni o regolatori di crescita (*plant growth regulators*, PGR):
 - **Thidiazuron (TDZ)** (1 mg/ml), appartenente alla famiglia delle citochinine di sintesi, induce la proliferazione. Preparazione: aggiungere 100 mg di TDZ in un beaker con un'ancoretta magnetica; aggiungere una goccia di dimetilsolfossido (DMSO) e 100 ml di acqua sterile deionizzata. Lasciare sciogliere per agitazione. Conservare a -20 °C;
 - **Acido 2,4 diclorofenossiacetico (2,4-D)** (1 mg/ml), appartenente alla famiglia delle auxine di sintesi, induce la radicazione e la formazione del callo meristematico. Preparazione: inserire 100 mg di 2.4-D in un beaker con una ancoretta magnetica; aggiungere una goccia di etanolo

o di NaOH 1N e 100 *ml* di acqua sterile deionizzata. Lasciare sciogliere per mescolamento. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 6 mesi;

- **Acido 3-indolbutirrico (IBA)** (1 *mg/ml*), appartenente alla famiglia delle auxine di sintesi. Preparazione: aggiungere 50 *mg* di polvere in un beaker da 50 *ml* e farla disciogliere in agitazione aggiungendo alcune gocce di NaOH 1N; portare a volume con acqua Milli-Q (deionizzata e purificata). Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi;
- **6-Benziladenina (BA)** (1 *mg/ml*), appartenete alla famiglia delle citochinine. Preparazione: aggiungere 50 *mg* di BA in un beaker, aggiungere delle gocce di NaOH 1M finché non si dissolve. Portare a 50 *ml* con acqua Milli-Q. Durante il mescolamento potrebbe essere richiesta un'ulteriore aggiunta di acqua per mantenere il materiale in soluzione. Conservare a -20 °C per un massimo di 6 mesi.
- Antibiotici:
 - **Rifampicina** (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** (100 *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;
 - **Cloramfenicolo** (50 *mg/ml*), preparazione: inserire 500 *mg* di polvere in 10 *ml* di etanolo e utilizzare un filtro sterile da 0.22 μm per filtrare la soluzione in Epperndorf da 1,5 *ml*. Se aliquotato è possibile la conservazione a -20 °C per un massimo di 6 mesi;
 - **Kanamicina** (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 $0.22 \mu m$ per filtrare la soluzione in Eppendorf da $1,5 ml$. Conservare per un massimo di 6 mesi a $-20^{\circ}C$;

- **Cefotaxime** ($100 mg/ml$), preparazione: sciogliere $1 g$ di polvere in $10 ml$ di acqua deionizzata (Milli-Q) tramite agitatore magnetico. Utilizzare un filtro sterile da $0.22 \mu m$ per filtrare la soluzione in Eppendorf da $1,5 ml$. Conservare a $-20^{\circ}C$ per un massimo di 6 mesi.
- **Acetosiringone** ($20 mg/L$), 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 $0.22 \mu m$ per filtrare la soluzione in Eppendorf da $1,5 ml$. Conservare a $-20^{\circ}C$ per un massimo di 6 mesi.

Le soluzioni degli stock di antibiotici sono state preparate in ambiente non sterile, quindi, una volta ottenuta la soluzione a concentrazione nota, viene travasata sotto cappa a flusso laminare con l'ausilio di un filtro sterile da $0.22 \mu m$, in contenitori Eppendorf sterili. In questo modo otteniamo delle soluzioni stock sterilizzate per filtrazione, in quanto gli antibiotici sono termolabili e quindi non sarebbe possibile sterilizzare le soluzioni in altro modo.

3.2.3 Terreni utilizzati nel protocollo di trasformazione

Durante la prova di trasformazione sono stati preparati diversi terreni di coltura, con diverse formulazioni a seconda del tipo di impiego. Infatti, durante il protocollo di trasformazione e rigenerazione sono stati utilizzati terreni per la crescita delle colonie batteriche (terreno di inoculo), terreni per la trasformazione (terreno di infezione e terreno di co-coltura), soluzione (LWS) per il lavaggio dei tessuti, post infezione, terreno di selezione e rigenerazione, terreno di proliferazione, terreno di radicazione, terreno per la frigoconservazione del materiale vegetale OGM. I terreni di coltura impiegati sono i seguenti:

- terreni per la crescita delle colonie di *Agrobacterium tumefaciens*:
 - 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 vengono aggiunti dopo la sterilizzazione poiché termolabili: spectinomina (100 mg/L), rifampicina (25 mg/L) e cloramfenicolo (10 mg/L);

- terreni per la trasformazione:
 - 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 (*Agrobacterium tumefaciens* – foglie), MSH0: 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): 4.4 g/L di MS con vitamine, 30 g/L di saccarosio, 7.5 g/L di plant agar, pH 5.7 (tamponato con KOH); vengono aggiunti i regolatori di crescita (PGRs) TDZ e 2,4D, nelle concentrazioni rispettive di 0.5 mg/L e 0.02 mg/L, e, dopo autoclave, gli antibiotici kanamicina monosolfato e cefotaxime, nelle concentrazioni rispettive di 10 mg/L e 200 mg/L;
- terreno di allungamento (utilizzato per il trasferimento dei germogli rigenerati dal callo meristemico): 50 ml/L di soluzione macroelementi (stock concentrato 20x), 10 ml/L di soluzione microelementi (stock concentrato 100x), 5 ml/L di vitamine (stock concentrato 100x), 7 g/L di plant agar, 30 g/L di saccarosio; regolatore di crescita (PGR) BA, concentrazione 0.25 mg/L; antibiotici kanamicina monosolfato e cefotaxime, dopo autoclave, nelle concentrazioni rispettive di 10 mg/L e 200 mg/L;
- Terreno di radicazione, MS0: 4.4 g/L di MS con vitamine incluse, 30 g/L di saccarosio, 7.5 g/L di plantagar, pH 5.7 (tamponato con KOH);
- MS 1/2: Terreno per la frigoconservazione delle linee di fragola (MS 2.63 g/L di MS con vitamine, 40 g/L di saccarosio, 7 g/L di plant agar, pH 5.7 (tamponato con KOH);
- Soluzione di lavaggio tessuti (LWS): H₂O sterile con aggiunta di 500 mg/L di cefotaxime.

La ricetta utilizzata per il terreno di rigenerazione (MS + TDZ 0.5 mg/L e 2,4D 0.02 mg/L) deriva da un precedente lavoro di tesi, dove la cv. Romina ha mostrato un tasso

di rigenerazione del 30% sul totale degli espianti. La preparazione dei terreni è stata fatta utilizzando una bilancia di precisione, un agitatore magnetico e la vetreria necessaria per la preparazione dei substrati (beaker, cilindri graduati e bottiglie in vetro pirex con guarnizione sul tappo, utilizzate per autoclavare). Dopo la preparazione delle soluzioni e l'aggiunta dei PGR, si procede con un ciclo di autoclave a pressione di vapore. Il ciclo di autoclave è un procedimento utilizzato per la sterilizzazione dei terreni e della vetreria, alla temperatura di 121 °C per 20 minuti, alla pressione di 1 *bar*; solo dopo il ciclo di autoclave, quando i terreni si presentano ancora allo stato liquido con temperature intorno ai 60 °C, si procede all'aggiunta degli antibiotici (sono termolabili) sotto cappa a flusso laminare orizzontale, evitando contaminazioni.

3.2.4 *Agrobacterium tumefaciens*: ceppo, vettore e agente selettivo

Nella prova di trasformazione è stato utilizzato il ceppo GV3101 di *Agrobacterium tumefaciens* portante il plasmide pK7WG2D, esprime il costrutto genico 35S-FT1-GFP-NPTII. Le regioni codificanti (cassette geniche), contenute nel plasmide, sono costituite dal promotore costitutivo transgenico 35S del virus del mosaico del cavolfiore (*CaMV 35S*), dal gene di interesse *FT1* (FLOWERING LOCUS T) cisgenico, dal gene reporter codificante la proteina green fluorescent protein (GFP) di tipo transgenico e dal gene di resistenza alla kanamicina monosolfato *NPTII* transgenico (Figura 5). La *neomicina fosfotransferasi II* (*NPTII*) è il gene marcatore di selezione usato più comunemente, per la sua ottima efficienza nella selezione dei tessuti rigeneranti transgenici e nella selezione di cloni transgenici stabili (Cappelletti *et al.*, 2015).

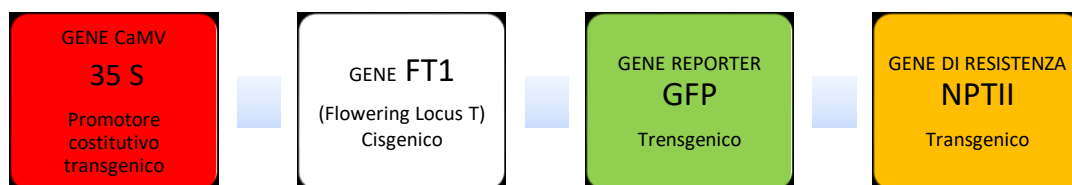


Figura 5: costrutto 35S::FT1 del plasmide pK7WG2D.

Questo costrutto genetico utilizzato nel protocollo di trasformazione, è stato fornito dalla prof.ssa Denoyes, INRA (Istituto nazionale per la ricerca in agricoltura, Bordeaux), identificato con il codice 35S::FT1.

3.2.5 Protocollo di trasformazione

Il protocollo di trasformazione utilizzato nella prova, è stato messo a punto facendo riferimento a un precedente lavoro di tesi e al lavoro di ricerca sulla trasformazione genetica, mediata da *A. tumefaciens*, in fragola coltivata (Cappelletti *et al.*, 2015).

Il protocollo comprende 7 fasi principali: (1) la preparazione dell'inoculo batterico, (2) il prelievo e la preparazione del materiale vegetale (espianto da germogli in allungamento in vitro), (3) la fase di infezione mediata da *Agrobacterium*, (4) la rigenerazione e la selezione dei tessuti trasformati, (5) la fase di allungamento dei germogli, (6) la fase di radicazione e infine, (7) la fase di ambientamento delle linee ottenute.

1. Preparazione dell'inoculo:

Dopo aver versato il terreno di coltura LB (per la crescita delle colonie batteriche) in piastre Petri, si procede piastrando il ceppo GV3101 di *Agrobacterium tumefaciens*, crioconservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'inoculo così, piastrato sul terreno solido, viene incubato a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. Al termine del periodo di incubazione, singole colonie batteriche vengono inoculate in tubi di infezione (Falcon da 50 ml), contenenti 10 ml di terreno LB liquido con i rispettivi antibiotici spectinomomicina, rifampicina e cloramfenicolo (Figura 6).



Figura 6: Soluzione di infezione (LB liquido + *A. tumefaciens* GV3101).

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 osservare la vitalità delle colonie batteriche quindi, la loro proliferazione, viene misurata la concentrazione allo spettrofotometro. Prendiamo un volume di 1 *ml* di soluzione di infezione per ogni tubo e lo inseriamo nelle rispettive cuvette, prepariamo anche 2 cuvette dove andremo ad inserire solo il terreno LB liquido, da utilizzare come controlli (bianchi). Il parametro misurato è l'OD (Optical Density), cioè l'assorbanza della soluzione, ad una lunghezza d'onda di 600 *nm*. Valori di OD ottimali, dovrebbero essere compresi tra 0.5 e 1, corrispondenti a una densità di inoculo di 10^8 cellule batteriche per *ml* di soluzione, nel nostro caso sono stati rilevati valori di OD più elevati, rispettivamente:

- Falcon 1, OD 1.6488;
- Falcon 2, OD 1.7220;
- Falcon 3, OD 1.6050.

Valori di OD così elevati, a volte, possono essere indice di contaminazioni o presenza di cellule che hanno raggiunto il plateau nella loro curva di crescita. Visto che sono state preparate 2 Falcon in più, si andranno a scegliere le 7 che si avvicinino maggiormente all'OD di 1.

Una volta misurato il valore di OD all'interno dei tubi di infezione, si procede con la pellettizzazione, in centrifuga, a 2500 *rpm* per 15 minuti, alla temperatura di $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Questo procedimento ci permette di eliminare il surnatante e ottenere il pellet. Andiamo a risospendere il pellet aggiungendo 40 *ml* per Falcon di MS 20 e aggiungiamo acetosiringone ad una concentrazione finale di 100 μM , per attivare i geni di virulenza; mettiamo i tubi in agitazione per 5 ore alla temperatura di $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2. Prelievo e preparazione degli espianti:

Preleviamo foglie, da colture micropropagate in fase di allungamento, con la lamina fogliare ben espansa e di dimensioni medie. Andiamo ad imprimere dei tagli trasversali, con il bisturi, sulla pagina inferiore delle foglie, facendo attenzione a non intaccare le nervature centrali. Manteniamo le foglioline in piastre Petri con acqua

sterile, per evitare l'ossidazione dei tessuti, inserendo 30 foglioline per piastra. Successivamente andiamo a prendere le 15 piastre Petri, preparate precedentemente, con terreno di co-coltura MSH0, e adagiamo su ogni piastra un disco di carta da bancone (3M) sterile. Prepariamo una soluzione costituita da MS20 liquido e acetosiringone (100 μM) e ne disperdiamo 500 μl su ogni dischetto di carta mediante l'uso di una micropipetta.

3. Infezione mediata da *A. tumefaciens* e co-coltura:

Terminate le 5 ore di agitazione, in ciascun tubo di infezione vengono inserite 30 foglie



Figura 7: Tubi di infezione con 30 foglie per Falcon.

(Figura 7). Questi vengono ricoperti con carta argentata (ambiente buio) e messi in agitazione, a 150 rpm, per 15 minuti, a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al termine dei 15 minuti, le foglie, vengono estratte e messe ad asciugare in vassoi di alluminio rivestiti con dischi di carta da bancone (3M); una volta asciutte le andiamo a posizionare sulle piastre Petri, di co-coltura (MSH0 + MS20 + acetosiringone), adagate sul lato abassiale (pagina inferiore) della foglia, nel numero di 15 per piastra (Figura 8).

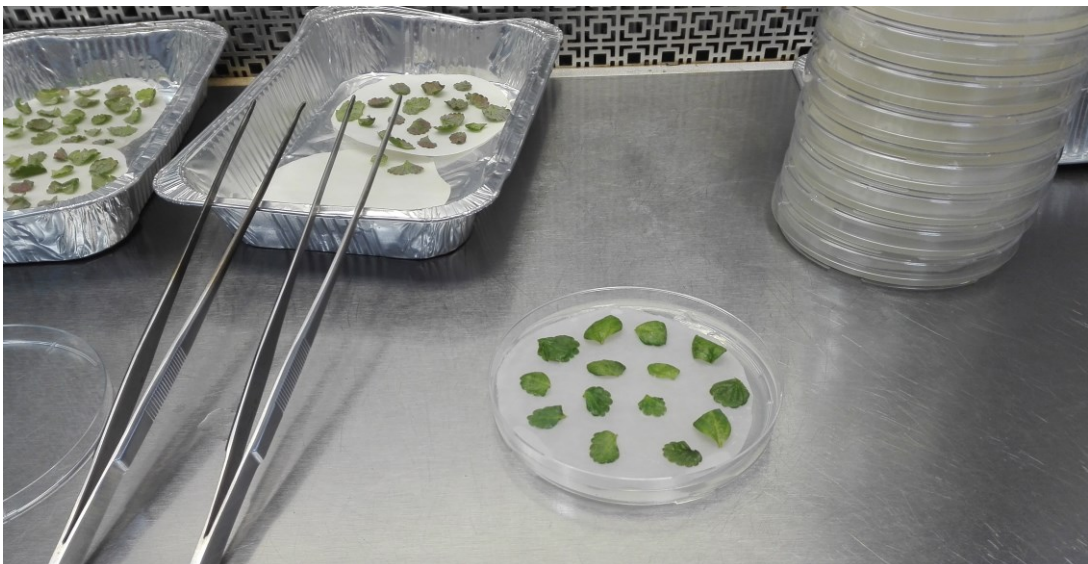


Figura 8: Fase di trasferimento degli espianti sul terreno di co-coltura.

Una volta chiuse le Petri e averle rivestite con carta argentata (condizione di buio) le andremo a mettere in camera di crescita a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 48 ore. Al termine del periodo di co-coltura andiamo a fermare l'infezione trasferendo le foglie dal terreno a Falcon contenenti la soluzione per il lavaggio dei tessuti (LWS), per 5 ore a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4. Rigenerazione e selezione degli eventi di trasformazione genetica:

Terminate le 5 ore le foglie sono state estratte dalla soluzione di lavaggio e poste ad asciugare in vassoi di alluminio rivestiti con carta da bancone (3M) sterile. Una volta asciutte sono state adagiate sul terreno di selezione e rigenerazione (LRSM), 10 per ogni piastra Petri, con la superficie abassiale (pagina superiore) della foglia a contatto con il substrato. Le Petri vengono impilate e avvolte prima con pellicola, per evitare la disidratazione, successivamente con carta argentata, per favorire le condizioni di buio e indurre la callogenesi; una volta etichettate vengono poste in camera di crescita alla temperatura di $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, per 3 settimane. Per la fragola, il più alto tasso di rigenerazione dei tessuti fogliari è promosso da un primo periodo di incubazione (3 settimane) a buio continuo e poi da 16 ore a intensità luminose di $70\text{ }\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ e 8 ore buio, a $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Cappelletti *et al.*, 2015).

Nel protocollo di trasformazione sono stati utilizzati i geni *GFP* e *NPTII* per la selezione dei rigenerati. Il gene *NPTII*, neomicina fosfotransferasi II, codifica per la resistenza all'antibiotico kanamicina monosolfato; questo antibiotico è stato addizionato nel mezzo di coltura durante la fase di rigenerazione, per selezionare i tessuti meristemati che non avevano subito la trasformazione genetica, inducendo la loro necrosi. Solo le cellule che hanno acquisito il transgene a cui quindi, il costrutto conferisce la resistenza all'antibiotico, sopravvivono (ad eccezione delle linee Escape). Il gene *GFP*, denominato gene reporter, codifica per la produzione della *green fluorescent protein*. La proteina GFP, colpita da raggi UV, al buio, emette una fluorescenza verde ($\lambda_{EX} = 480\text{ nm}$ e $\lambda_{EM} = 510\text{ nm}$); questo carattere è utile durante il processo di identificazione e selezione visiva che, grazie al gene reporter, viene svolto attraverso l'utilizzo di uno stereomicroscopio (Leica MZ10F), con luce UV, dotato di filtro GFP (*Figura 9*). Le immagini, riportate su questo elaborato, riguardo

agli eventi di trasformazione sono state acquisite attraverso la fotocamera Leica DFC 450 C ed elaborate tramite Leica Application Suite V.4.5.



Figura 9: Stereoscopio Leica MZ10F, dotato di lampada UV e filtro GFP.

Trascorse le 4 settimane si procede con il primo rilievo sull'eventuale espressione transiente della proteina GFP, visibile dove è iniziato il processo di de-differenziazione e l'induzione alla formazione del callo meristemico. Contemporaneamente alle operazioni di rilievo della GFP, tramite lo stereoscopio con filtro GFP, sotto cappa a flusso laminare orizzontale, andiamo a trasferire le foglie, capovolte con lato adassiale adagiato sul mezzo di coltura, su terreno fresco di selezione e rigenerazione, in contenitori con maggiore capienza, le microbox (*Figura 10*).

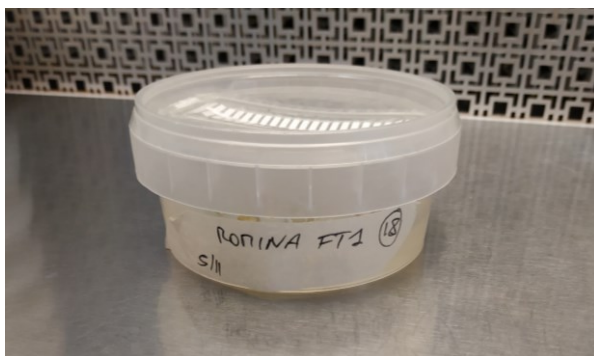


Figura 10: Microbox con terreno LMRS, etichettata.

Solitamente la formazione del callo, durante la prima sub-coltura, avviene a ridosso del picciolo fogliare, dove sono già presenti cellule meristematiche (totipotenti). Durante il primo trasferimento le microbox vengono etichettate e le foglie vengono numerate, da destra a sinistra su diverse linee a partire da una foglia etichettata (come in *Figura 11*). Una volta completato il trasferimento le microbox vengono poste in camera di crescita (*Figura 12*), con fotoperiodo di 16 ore di luce, (giorno lungo) con intensità luminosa di $250 \mu\text{mol m}^2/\text{s}$.

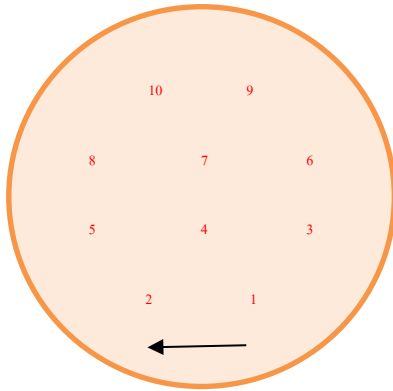


Figura 11: Numerazione foglie nella microbox.



Figura 12: Camera di crescita a temperatura e fotoperiodo controllati.

Il trasferimento delle foglie viene effettuato, a intervalli di 2 settimane, su terreno di selezione e rigenerazione (LMRS) fresco, andando a trasferire solamente i tessuti ancora vitali. L'attività morfogenetica viene monitorata ad ogni sub-coltura. Nelle fasi di trasferimento bisogna porgere molta attenzione ad evitare di introdurre contaminazioni, che potrebbero compromettere tutti gli espianti all'interno della

microbox, portando alla perdita del materiale trasformato adiacente al punto di contaminazione. In seguito, ad intervalli di 14 giorni, le foglie sono state trasferite su terreni di selezione freschi (LRSM), avendo cura di eliminare il materiale necrotico o contaminato.

5. Fase di proliferazione dei germogli putativamente trasformati:

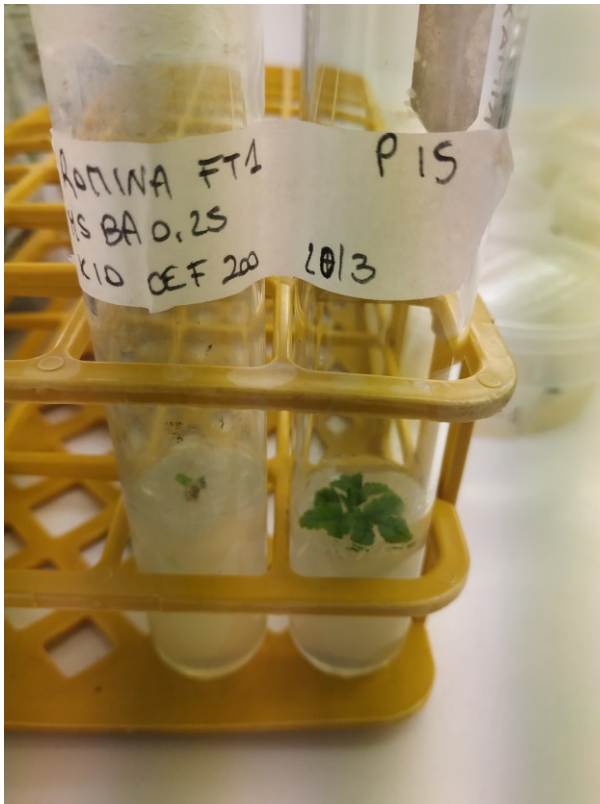


Figura 13: Primi germogli OGM ottenuti, messi in allungamento in tubi di vetro con terreno liquido.

A distanza di 12 settimane dal primo trasferimento, tutte le linee che presentavano GFP e 2 linee Escape, sono state trasferite in tubi in vetro contenenti terreno di proliferazione (BA 0.25 mg/L) con i rispettivi antibiotici kanamicina e cefotaxime (Figura 13). Anche la fase di allungamento è costituita da un diverso numero di sub-culture, 5-6, a intervalli di 2 settimane. In contemporanea, le microbox che presentavano ancora calli con GFP, venivano trasferite sempre sul terreno LMRS, per continuare a indurre possibili eventi di organogenesi.

6. Fase di allungamento e radicazione:

In uno step successivo i germogli delle diverse linee omogenee transgeniche, al raggiungimento di un adeguato sviluppo e stabilità, vengono trasferiti in vasi da di vetro, sul terreno di allungamento e radicazione (MS0). La fase di radicazione è costituita da diverse sub-culture (3-4) prima della fase critica di ambientamento. È durante questa fase che sono stati selezionati quattro germogli per ciascuna linea trasformata, per la frigoconservazione del materiale vegetale in tubo con il terreno di coltura MS MS 1/2.

7. Fase di ambientamento delle linee trasformate e escape:

I germogli radicati vengono trapiantati in vasi piccoli, contenenti torba (*Substrate 2, Klasmann-Deilmann GmbH*) sterilizzata. L'acclimatamento della pianta avviene in ambiente protetto da una calotta trasparente che permette il passaggio della luce e mantiene le piante in condizioni di umidità relativa elevata (fino al 90%), alla temperatura di $24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con fotoperiodo di 16 ore e intensità luminosa $300\text{ }\mu\text{mol m}^2/\text{s}$, al fine di promuovere la produzione di nuove radici. I cloni transgenici sono coltivati in screen-house, nel rispetto delle leggi sugli OGM, per le prove sperimentali.

3.2.6 Rilievo dati e analisi statistica

Ogni 2 settimane, durante il trasferimento, tutti gli espianti sono stati valutati visivamente, in modo da seguire l'evoluzione dei tessuti trasformati durante tutta la fase di rigenerazione. Sono stati rilevati dati riguardo il numero di espianti che presentavano l'espressione della GFP, numero di calli che esprimevano GFP per espianto, numero di germogli rigenerati che esprimevano GFP per espianto. I dati sono stati rilevati a partire dal primo trasferimento degli espianti sul terreno LRMS a intervalli di 30 giorni, successivamente sono stati analizzati mediante analisi della varianza a una via (ANOVA), e per valutare eventuali differenze significative ($p \leq 0,05$) è stato usato il test di Newman-Keul (test POST-HOC).

3.3 SPERIMENTAZIONE 3: valutazione della segregazione del costrutto 35S::FT1, in semenzali di fragola, ibridi tra la cv. Rociera e 3 linee GM della cv. Sveva

3.3.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale utilizzato per la valutazione è costituito da 112 semenzali, derivati da incroci controllati, tra la varietà Rociera, utilizzata come parentale femminile, e le 3 linee trasformate geneticamente della cv. Sveva, con il gene di interesse FT1 (*Flowering Locus T*), rispettivamente denominate FT1A, FT1B, FT1D (*Tabella 1*). I

semenzali sono stati seminati in vasetti piccoli su torba, all'interno della screen-house dell'UNIVPM (Figura 14).



Figura 14: Screen-house dell'UNIVPM, i semenzali sono in primo piano.

Ogni semenzale è stato etichettato con una sigla dalle iniziali AN17 (Ancona, 2017), che indicano la provenienza e l'anno di ottenimento dei semenzali, mentre i 2 numeri posti successivamente indicano, rispettivamente il diverso parentale maschile e lo specifico semenzale.

Semenzale	Parentale Femminile		Parentale Maschile	N° semenzali ottenuti	N° Cartellini
AN17,51	<i>Rociera</i>	X	FT1A	14	51-54
AN17,52	<i>Rociera</i>	X	FT1B	54	51-90
AN17,53	<i>Rociera</i>	X	FT1D	44	51-81
TOTALE				112	

Tabella 1: Combinazioni d'incroci effettuate tra Rociera, parentale femminile, e 3 linee di Sveva modificate con il gene FT1, usate come parentali femminili.

Rociera è una cultivar ottenuta in Spagna da Fresa New Material (Fnm), un organismo privato di breeding composto da vivaisti e produttori che, con le varietà Primoris, Rabida e Rociera, concentra oltre la metà della produzione di Huelva, l'area frugicola spagnola per eccellenza.

3.3.2 Metodi di valutazione dei semenzali

I semenzali sono stati messi a dimora la prima decade di aprile e sono stati valutati attraverso dei controlli visivi periodici, a cadenza settimanale, nel periodo successivo al germogliamento. Successivamente, durante l'ultimo rilievo visivo, effettuato la seconda decade di dicembre, sono state prelevate delle porzioni di tessuto, dei diversi organi vegetali, a campione, su ogni individuo. I tessuti campionati sono stati utilizzati per la visualizzazione dell'espressione della GFP allo stereomicroscopio (Leica MZ10F) dotato di lampada UV e filtro GFP. I dati sono stati rilevati come semenzali che presentavano fiori, semenzali che non presentavano fiori, semenzali che presentavano fiori e non esprimevano GFP. I dati raccolti, durante l'ultimo rilievo, sono stati analizzati per fare delle ipotesi riguardo alla segregazione del costrutto 35S::FT1 e del possibile riarrangiamento casuale di porzioni indipendenti di esso.

4. RISULTATI E OSSERVAZIONI

4.1 SPERIMENTAZIONE 1: - Valutazione fenotipica delle linee

FT2

4.1.1 Altezza media pianta

La prima raccolta dei dati, in screen house, è stata effettuata nel mese di maggio, periodo che coincide con la fase di fioritura della fragola cv. Sveva. Le 3 linee transgeniche FT2 valutate, da subito hanno mostrato un maggiore rigoglio vegetativo; infatti, attraverso l'analisi dei dati, è stato osservato che, l'altezza media dei cloni F1G1, F3G1 e F3G2 risulta essere significativamente più elevata rispetto al controllo Wild Type (WT) nei primi 2 mesi (maggio, giugno). L'altezza media più elevata è stata mostrata dai cloni della linea F3G2 (anche se non differente a livello statistico dalle altre due linee transgeniche), nel mese di maggio risultava essere 39,1 cm, a differenza del controllo Wild Type, che mostrava uno sviluppo medio di 35,7 cm. Il mese di luglio nelle linee F1G1 e F3G1 si è riscontrata ancora differenza significativa rispetto all'altezza media dei controlli WT; per la linea F3G2, invece, possiamo osservare una riduzione dell'altezza della pianta. Questo evento porta la media al di sotto della minima differenza significativa rispetto al controllo WT. Dall'analisi dei dati rilevati nel mese di ottobre, ultimo rilievo, è risultata una riduzione dell'altezza media dei cloni delle 3 linee OGM e anche del controllo WT dovuta alla riduzione della lunghezza del picciolo delle foglie centrali, che si verifica prima della fase di riposo vegetativo. Le prime due linee, F1G1 e F3G1, risultano avere un parametro di poco inferiore a quello del controllo WT. Per la linea trasformata F3G2, invece, nel mese di ottobre si evidenzia un'altezza media significativamente inferiore al controllo WT, come possiamo osservare nel *Grafico 1*.

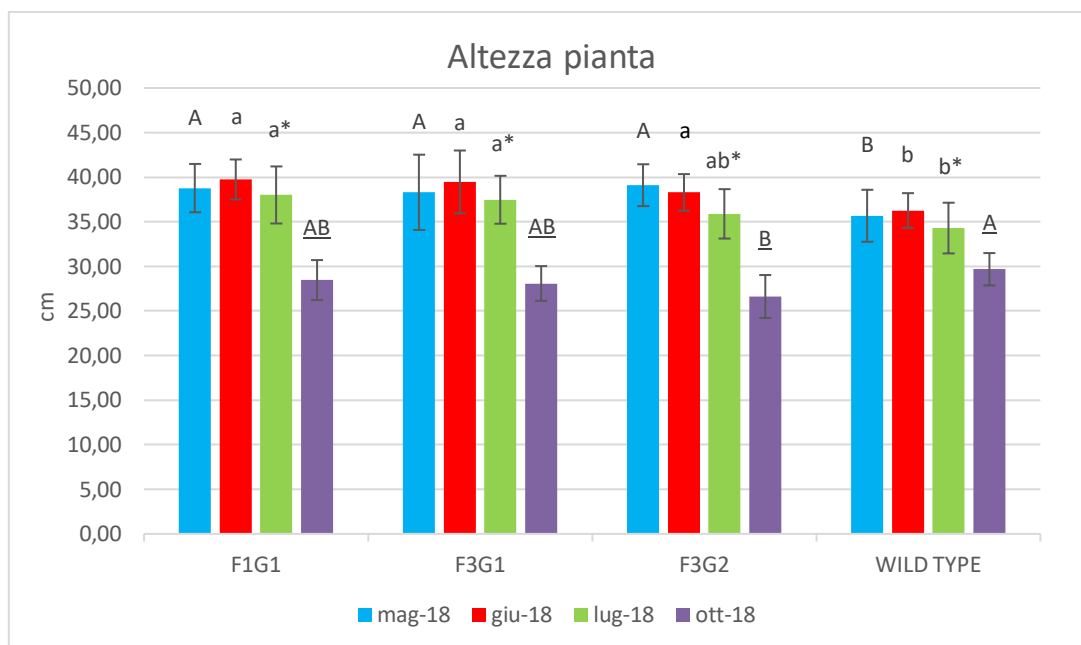


Grafico 1: Altezza media (cm) dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilievo dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.1.2 Altezza media del picciolo fogliare

Nel mese di maggio le tre linee transgeniche, F1G1, F3G1 e F3G2, hanno mostrato un'altezza del picciolo fogliare mediamente più alta rispetto al controllo non trasformato. Nel mese successivo, giugno, le misure sono risultate uniformi senza alcuna differenza significativa, come è possibile osservare nel *Grafico 2*. Nel rilievo dati, del mese di luglio, è emersa differenza significativa tra i cloni della linea F1G1 e il controllo WT, la media dell'altezza del picciolo fogliare di F1G1 risulta essere di 2,8 cm superiore a quella del controllo. Il mese successivo, ottobre, il parametro, altezza media del picciolo fogliare, risulta uniforme tra le linee F1G1, F3G1 e WT, non mostrando differenze significative. La linea F3G2, invece, nel mese di ottobre, risulta avere un'altezza media del picciolo fogliare, significativamente inferiore, alla media dei controlli WT.

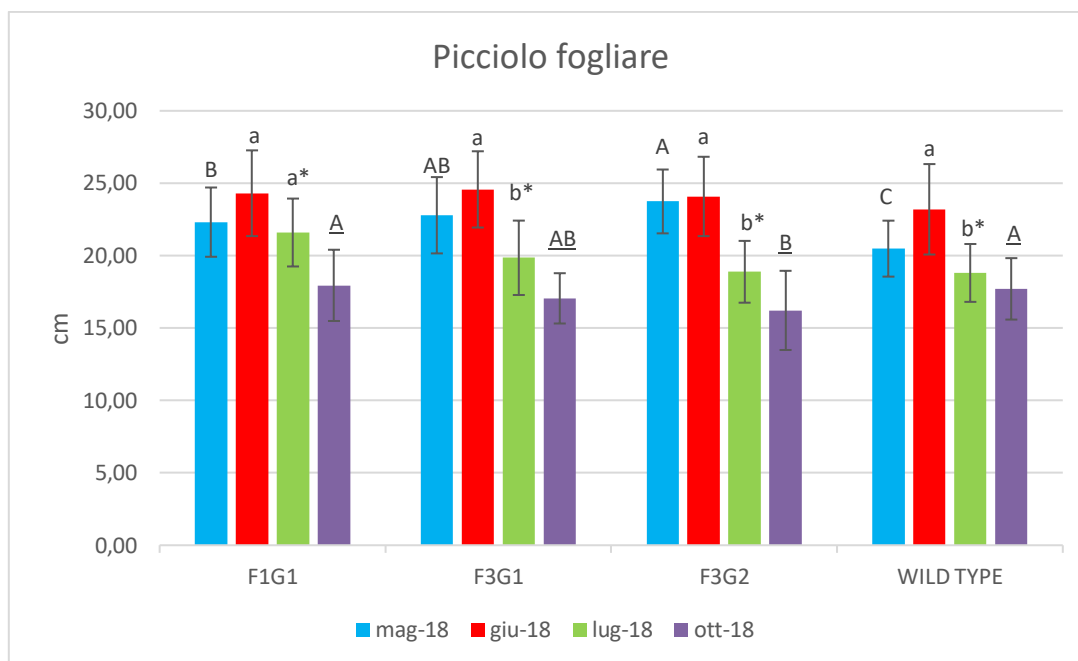


Grafico 2: Altezza media (cm) del picciolo fogliare, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilievo dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.1.3 Altezza e larghezza media delle foglioline centrali

Le foglie delle diverse linee GM, nei primi due rilievi di maggio e giugno, sono risultate più ampie rispetto al controllo WT, come possiamo osservare nei *Grafico 3* e *Grafico 4*. Nel mese di luglio, si è notato un decremento dei due parametri (altezza e larghezza media delle foglie centrali), che sono tornati in linea con i valori espressi dalla linea di controllo WT. La linea F3G2, nel mese di ottobre, presenta un'altezza media della foglia di 5,8 cm e una larghezza media di 5,1 cm; parametri significativamente inferiori rispetto ai 6,1 cm relativi all'altezza media, e ai 5,4 cm della larghezza media della fogliolina centrale del controllo WT.

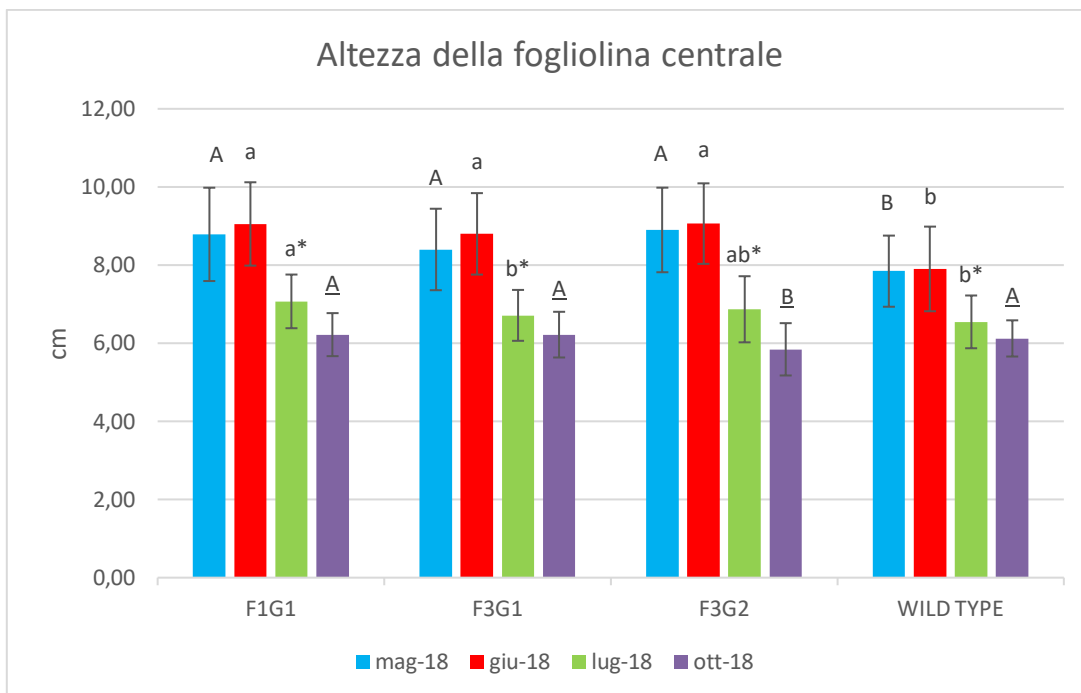


Grafico 3: altezza media (cm) della fogliolina centrale, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilevato dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

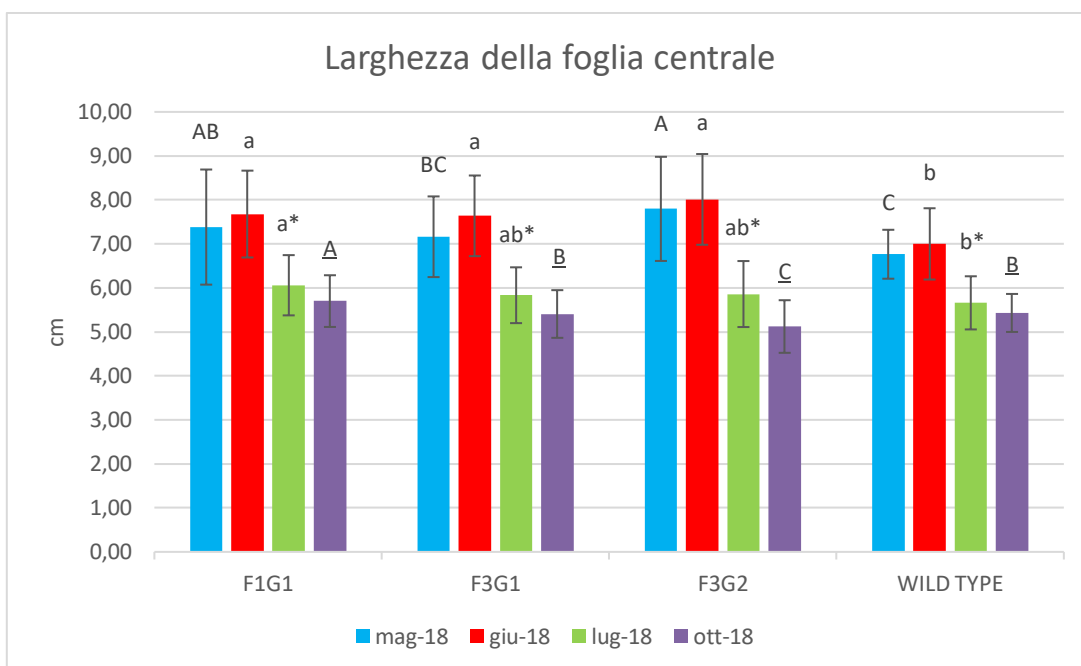


Grafico 4: Larghezza media (cm) della fogliolina centrale, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilevato dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio, durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.1.4 Numero medio di foglie

Nel primo rilievo, effettuato a maggio, il numero di foglie tra le diverse linee e il controllo WT, è piuttosto uniforme, ad eccezione della linea F1G1 che ha un numero di foglie medio significativamente maggiore. Nel mese di giugno, il numero medio di foglie della linea F1G1 (36,2 foglie per pianta), risulta significativamente superiore sia al controllo WT che, alle altre 2 linee GM (F3G1 e F3G2); il mese successivo, luglio, per la medesima linea il parametro subisce un decremento ma, rimane comunque significativamente superiore a quello del controllo e della linea F3G2. Il mese di ottobre, come possiamo osservare nel *Grafico 5*, le tre linee transgeniche presentano un numero medio di foglie 2 volte superiore al controllo e nettamente superiore alle medie collezionate precedentemente, sia dal controllo, che dalle medesime linee. Il numero medio di foglie più elevato è stato espresso dai cloni della linea F1G1 (52,9 foglie per pianta).

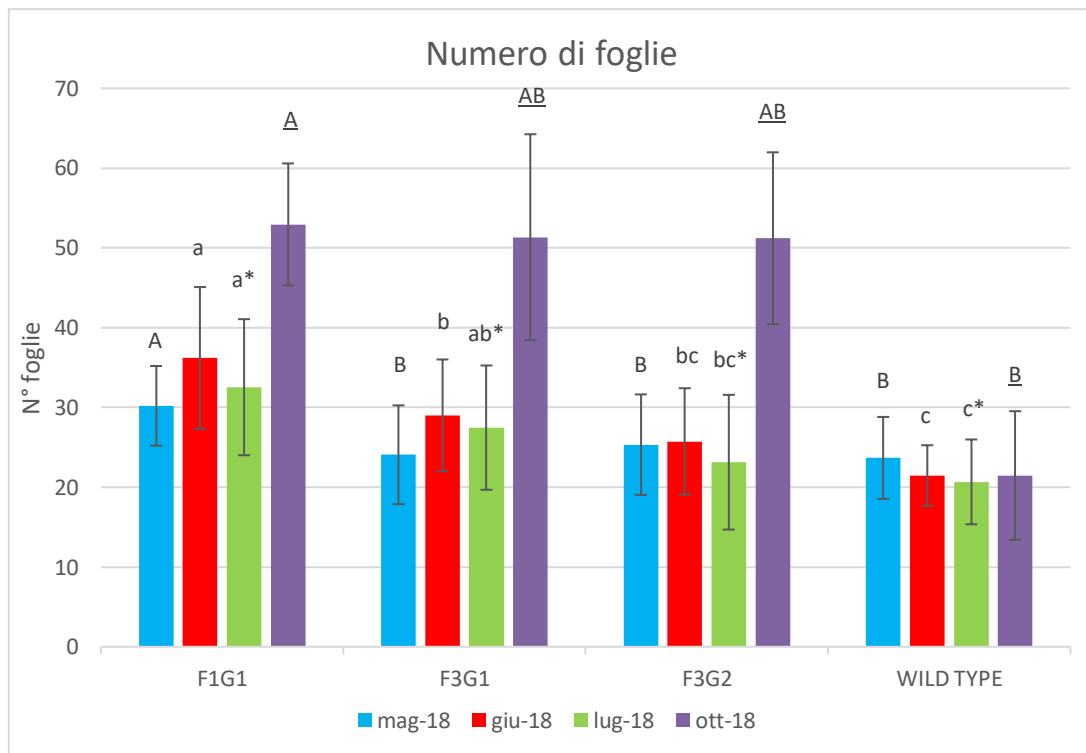


Grafico 5: Numero medio di foglie, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilievo dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.1.5 Numero medio di Infiorescenze

Durante tutto il periodo dei rilievi, anche se il primo è stato fatto a ridosso della fase di fioritura, le 3 linee GM non hanno emesso infiorescenze, ad eccezione di qualche sporadico caso, come si può notare nel *Grafico 6*. La linea trasformata F3G2, tra le 3 linee, risulta essere quella che ha emesso il numero medio di infiorescenze maggiore (0,9 nel mese di maggio e 1,2 nel mese di giugno); parametro comunque, di gran lunga inferiore rispetto al controllo WT (8,9 nel mese di maggio e 2,3 nel mese di giugno).

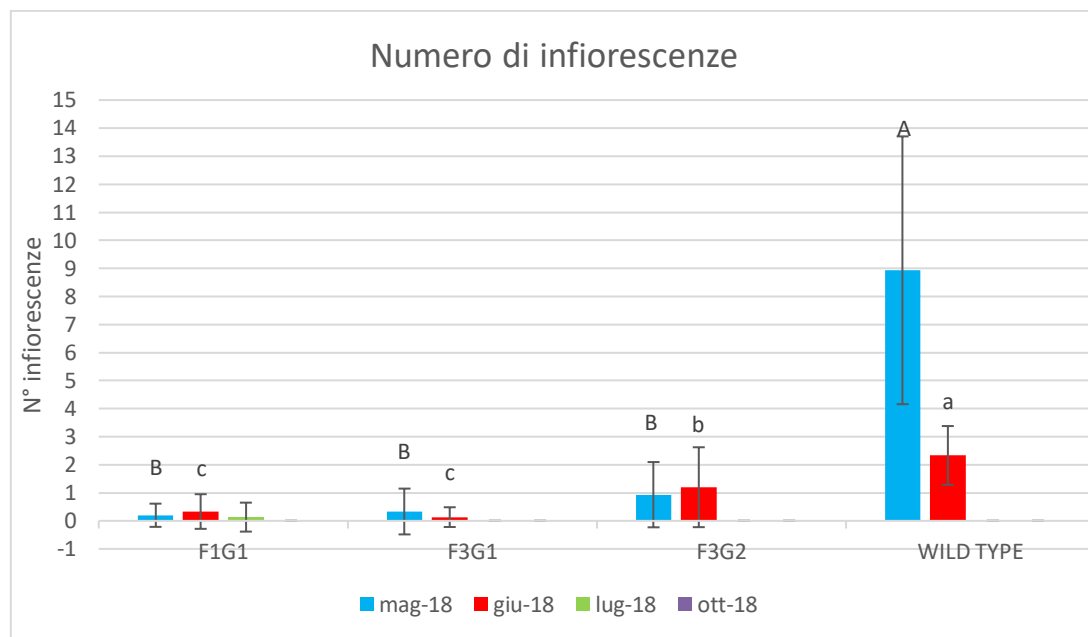


Grafico 6: Numero medio di infiorescenze, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilievo dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.1.6 Numero medio di stoloni

Durante il primo rilievo, effettuato a maggio, l'emissione di catene stolonifere risulta essere ridotta sia nelle 3 linee trasformate, che nella Wild Type. In questo mese si nota una minima differenza significativa tra la linea F3G2 e il controllo dove, il numero medio di stoloni emessi, dai cloni della linea trasformata, risulta essere significativamente superiore al controllo WT, come possiamo osservare nel *Grafico 7*. A partire dal mese successivo, giugno, le linee GM incrementano notevolmente la produzione di catene stolonifere. In questo mese, il controllo WT risulta avere un numero medio di stoloni di 5,1 mentre, la linea F3G1 in media ne presenta 9,4 per

clone. Dal secondo al terzo rilievo, effettuato a luglio, la produzione media di stoloni e rimasta più o meno uniforme per le 3 linee, F1G1, F3G1 e F3G2 mentre, risulta aumentare per il controllo WT, rimanendo comunque significativamente inferiore alle linee trasformate. Anche nel mese di ottobre, ultima raccolta dati, la produzione media di stoloni per le linee GM risulta in linea con i valori precedenti mentre, la produzione di stoloni nel controllo subisce un notevole decremento.

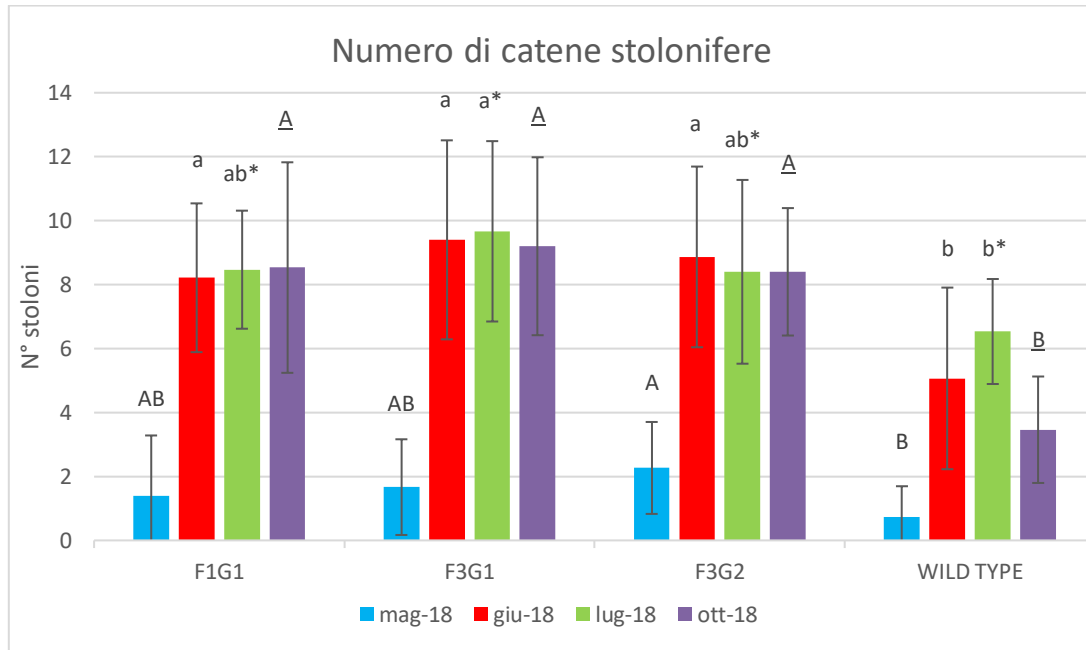


Grafico 7: Numero medio di catene stolonifere, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT2 (F1G1, F3G1 e F3G2) e del controllo (Wild Type). Rilievo dati effettuato, in screen house, nei mesi di maggio, giugno, luglio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo e ottobre. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2 SPERIMENTAZIONE 1: Valutazione fenotipica delle linee FT1

4.2.1 Altezza media pianta

Sulle 4 linee FT1 (FT1A, FT1B, FT1C, FT1D), è stato effettuato solo un rilievo, in corrispondenza del mese di maggio, perché le piante sono state infestate dal ragno rosso (*Tetranychus urticae*) e distrutte in brevissimo tempo; per cui, non è stato possibile effettuare i successivi rilievi biometrici. Come possiamo notare nel Grafico 8, per l'altezza media delle piante, le 4 linee GM risultano avere uno sviluppo significativamente inferiore ai 2 controlli Escape e WT. All'interno delle linee trasformate, le linee FT1B e FT1C, presentano un'altezza media dei cloni,

significativamente inferiore rispetto alle linee FT1A e FT1D. Le due linee di controllo, Escape e Wild Type, hanno espresso un'altezza media della pianta simile tra loro, 36,7 cm per l'Escape e 35,6 cm per i cloni WT.

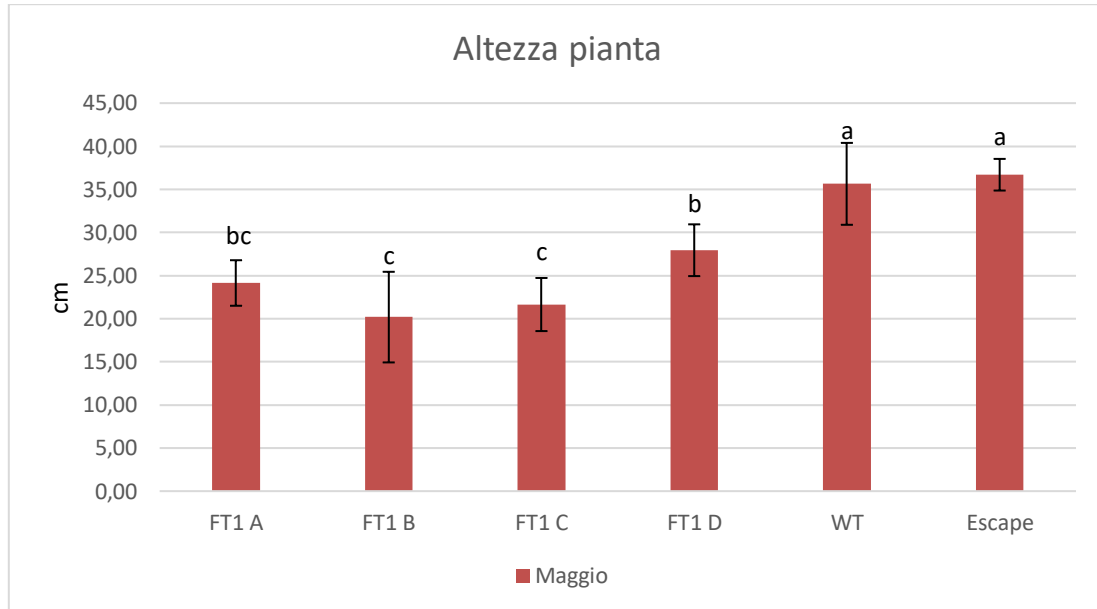


Grafico 8: Altezza media (cm) dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.2 Altezza media del picciolo fogliare

Andando ad osservare il Grafico 9, possiamo notare che, i valori di altezza media del picciolo fogliare rimangono in linea con i risultati dell'altezza media della pianta. Le linee FT1B e FT1C presentano altezze medie del picciolo, di gran lunga inferiori ai controlli Escape e WT; e comunque, risultano essere significativamente inferiori anche, alle altre 2 linee trasformate. Possiamo notare che c'è differenza significativa anche tra FT1A e FT1D, la linea FT1D ha una altezza media del picciolo di 2,1 cm in più rispetto a FT1A.

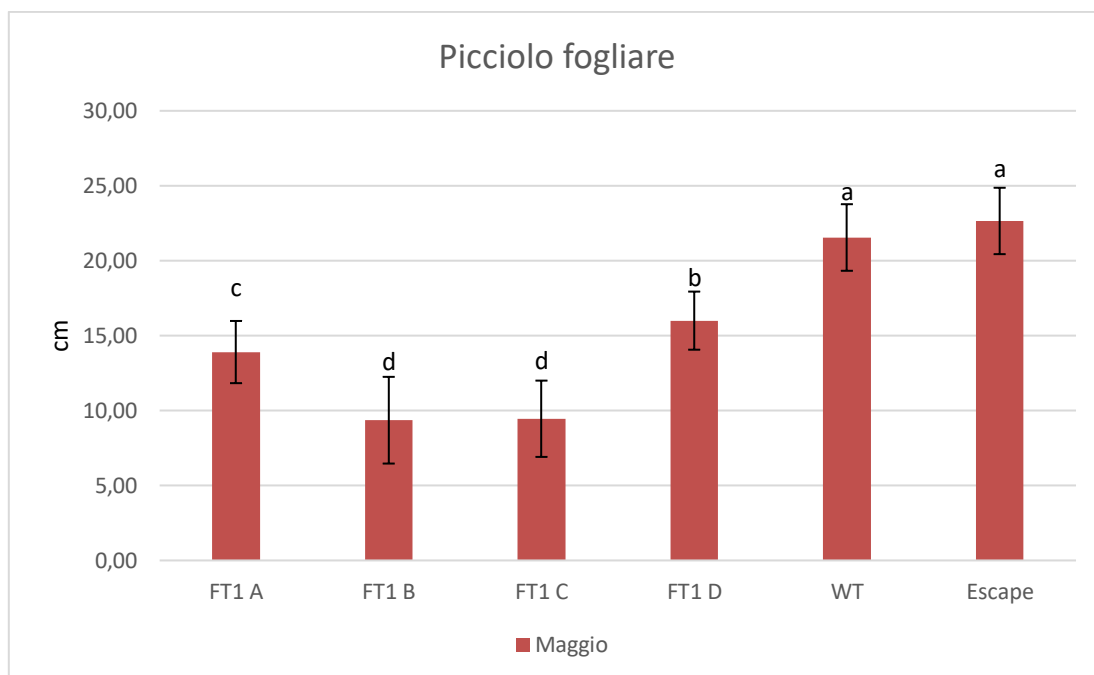


Grafico 9: Altezza media (cm) del picciolo fogliare, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.3 Altezza e larghezza media delle foglioline centrali

L'altezza media delle foglie, delle 4 linee trasformate con il gene FT1, risulta significativamente inferiore rispetto ai due controlli Escape e WT, come è possibile osservare nel *Grafico 10*. La larghezza media delle foglie centrali, in linea con i risultati di altezza media, si presentano significativamente inferiori rispetto ai controlli (Escape e WT); la linea FT1D, rispetto alle altre linee trasformate (FT1A, FT1B e FT1C), risulta avere una larghezza media della foglia significativamente superiore (*Grafico 11*).

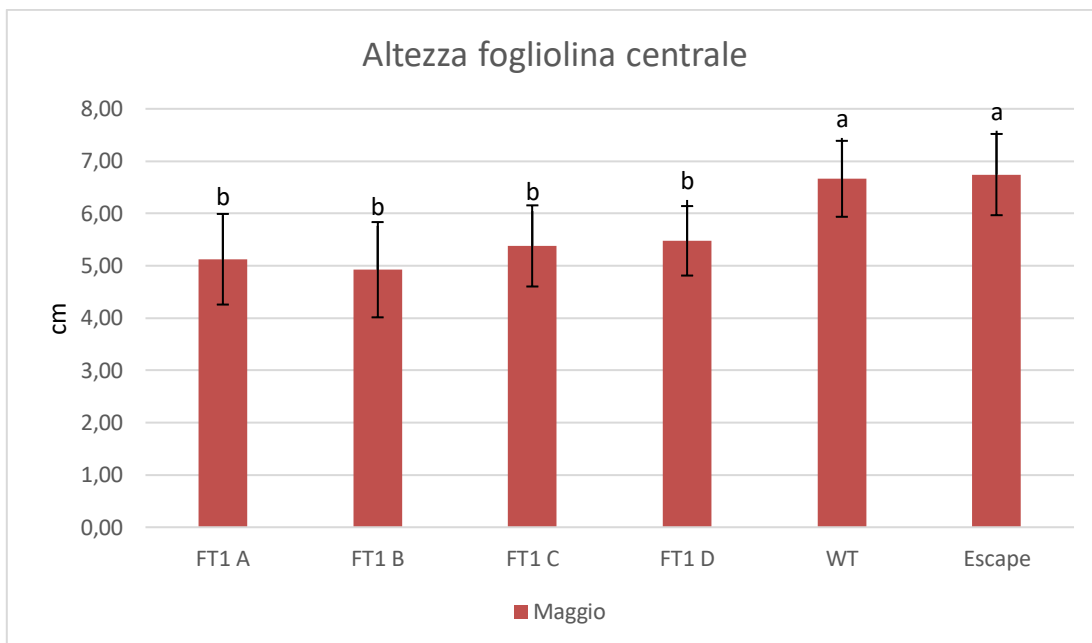


Grafico 10: Altezza media (cm) della foglia centrale, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

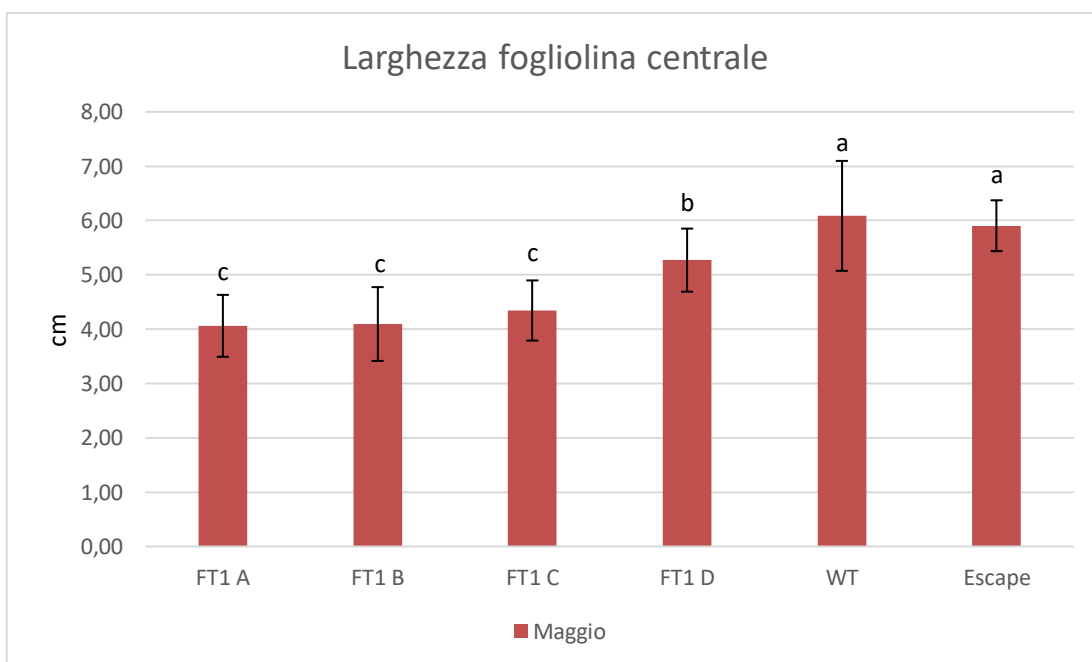


Grafico 11: Larghezza media (cm) della foglia centrale, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.4 Numero medio di foglie

Come possiamo notare nel *Grafico 12*, le linee trasformate FT1B e FT1C, presentano valori del numero medio di foglie, per clone, molto inferiori rispetto alle altre 2 linee GM e ai controlli Escape e WT. Le piante della linea FT1D, mostravano un numero medio di foglie per pianta di 43,3; le linee di controllo Escape e WT, invece, avevano prodotto un numero medio di foglie per pianta rispettivamente di 48 e 46,7. Tra il numero medio di foglie delle linee FT1D e i 2 controlli non c'è differenza significativa.

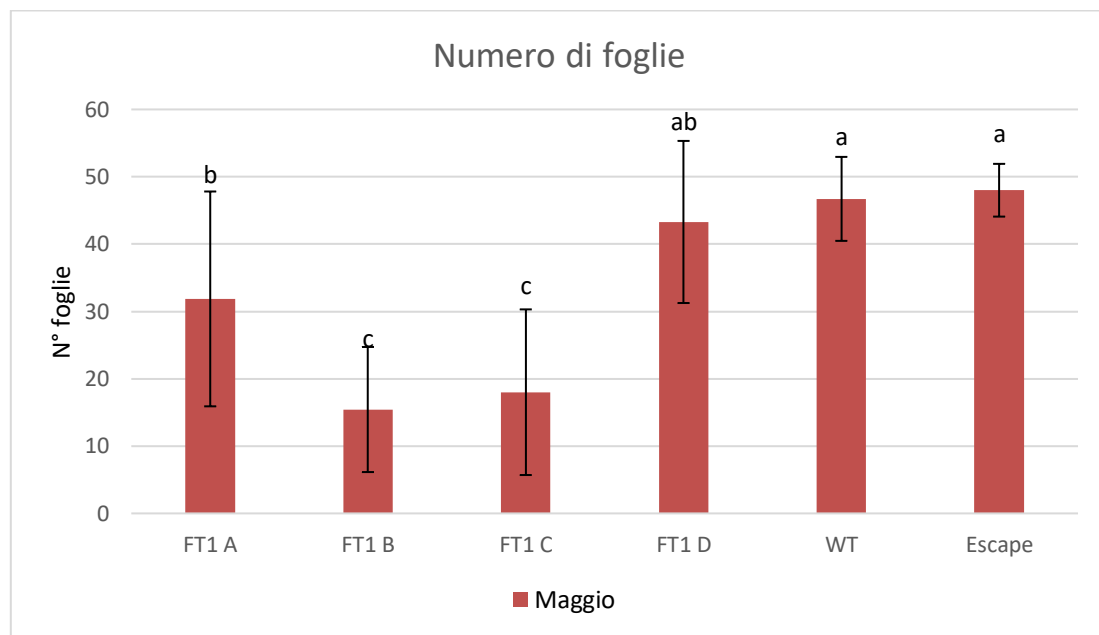


Grafico 12: Numero medio di foglie, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.5 Numero medio di germogli

Durante il rilievo dati di maggio, la linea trasformata FT1A, aveva un numero di germogli maggiore, statisticamente non significativo, rispetto alle due linee di controllo Escape e Wild Type. La linea FT1D, come si può notare dal *Grafico 13*, presenta un numero medio di germogli simile a quello dei 2 controlli Escape e WT. Le linee FT1B e FT1C hanno riportato un valore medio significativamente inferiore di germogli per pianta, rispetto ai 2 controlli e alle altre 2 linee trasformate (FT1A e FT1D).

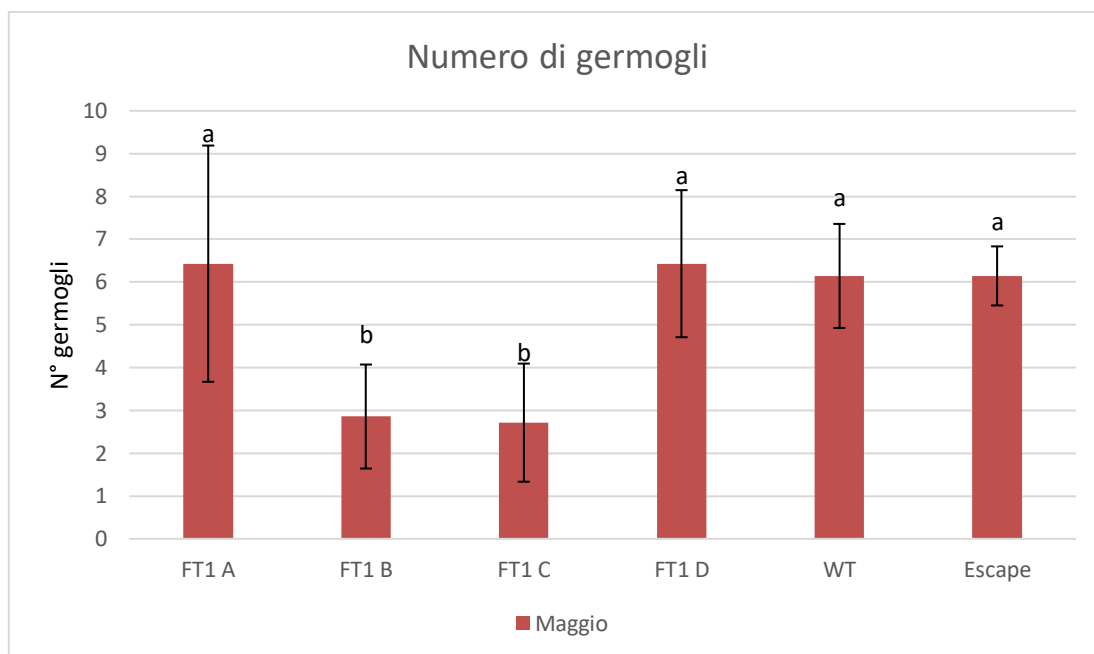


Grafico 13: Numero medio di germogli, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.6 Numero medio di infiorescenze

Dall'analisi statistica dei dati, è risultato che, la linea FT1A, a maggio, presentava il maggior numero di infiorescenze; parametro significativamente superiore ai controlli Escape e Wild Type ma, anche alle altre 3 linee GM (FT1B, FT1C e FT1D). Queste ultime, hanno espresso dei valori superiori ai controlli ma, statisticamente non significativi (Grafico 14).

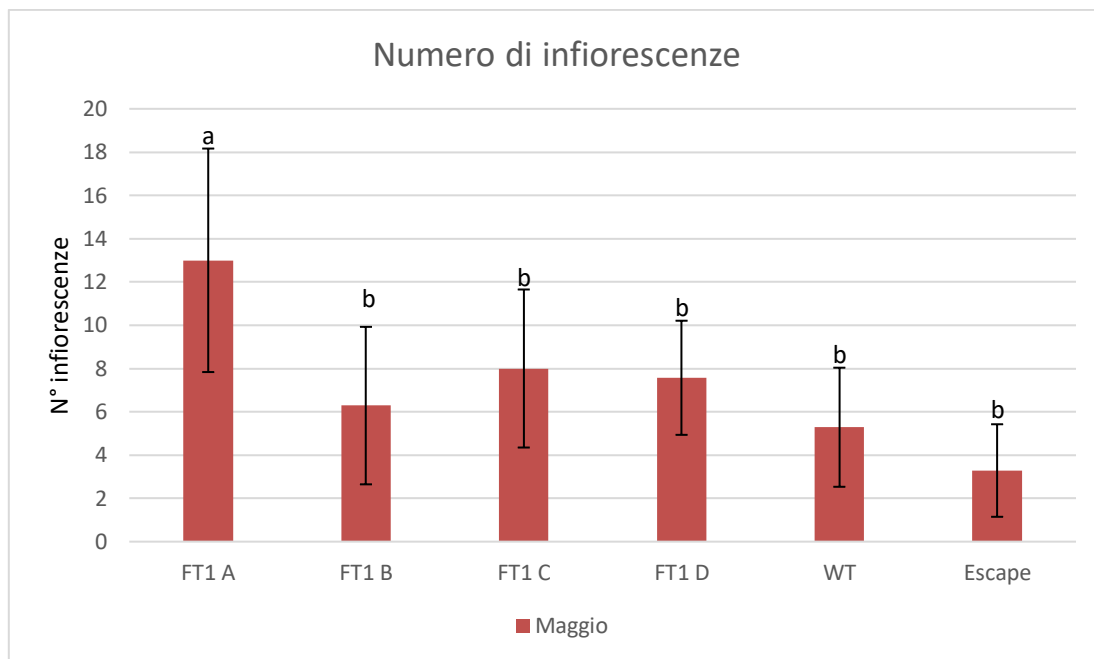


Grafico 14: Numero medio di infiorescenze, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.7 Numero medio di fiori

Durante il rilievo effettuato, a maggio, a ridosso della fioritura, tutte le linee inclusi i 2 controlli, portavano fiori sviluppati. Osservando il *Grafico 15*, risalta il maggior numero di fiori prodotto dalla linea FT1A (53,4 fiori per pianta, in media), significativamente maggiore rispetto alle linee trasformate FT1B e FT1D e alle linee di controllo Escape e WT. Anche la linea FT1C ha prodotto un maggior numero di fiori rispetto i controlli ma, statisticamente non significativo. Le restanti 2 linee trasformate hanno presentato i valori più bassi, in linea con i controlli Escape e WT, che portavano rispettivamente, 18,7 e 20 fiori.

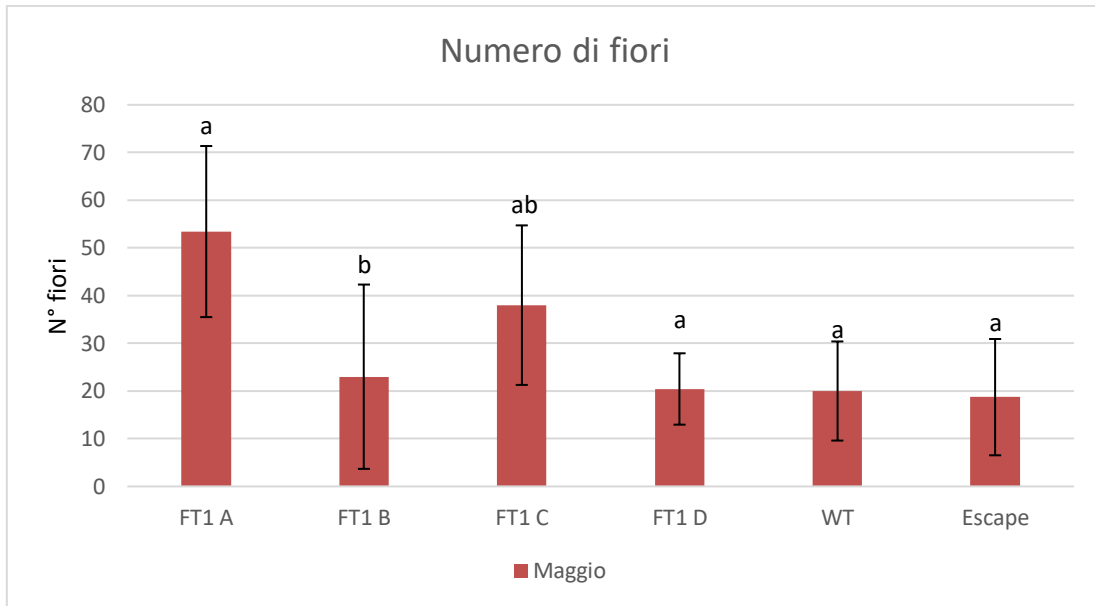


Grafico 15: Numero medio di fiori, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilevato dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.8 Numero medio di catene stolonifere

Nel mese di maggio, nessuna delle linee trasformate aveva emesso stoloni, a differenza dei due controlli Escape e WT, che presentavano in media, 4,3 e 2,6 stoloni. Come si può osservare nel *Grafico 16*, il numero medio di stoloni prodotto dalla linea di controllo Escape è significativamente superiore al numero prodotto dalla Wild Type.

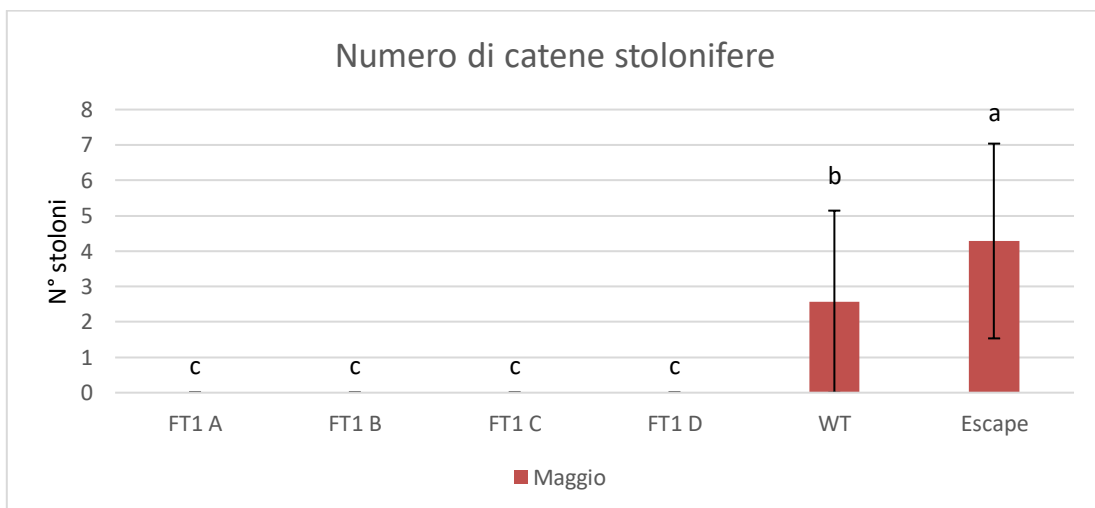


Grafico 16: Numero medio di catene stolonifere, dei cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilevato dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.2.9 Numero medio di frutti maturi

Il numero medio di frutti maturi, portati dai cloni, nel mese di maggio, è risultato essere nullo per la linea FT1A, insieme ai 2 controlli; questi, anche se portavano fiori sviluppati, non presentavano frutti maturi. La linea FT1C, come mostra il *Grafico 17*, è stata la linea che ha prodotto più frutti maturi, con differenza significativa rispetto alle linee FT1B e FT1D.

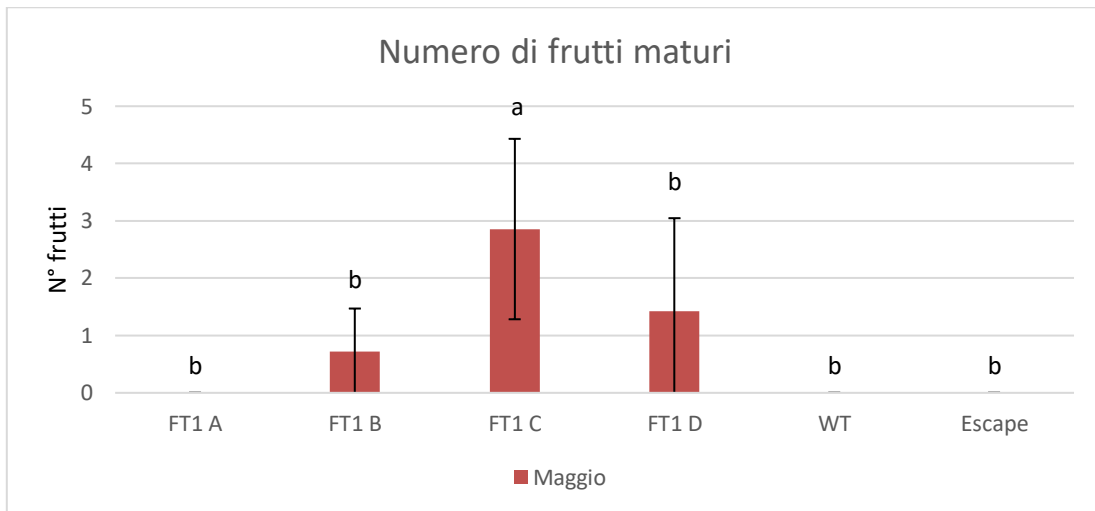


Grafico 17: Numero medio di frutti maturi, prodotti dai cloni di ogni linea trasformata con il gene FT1 (FT1A, FT1B, FT1C e FT1D) e dei controlli (Wild Type e Escape). Rilievo dati effettuato, in screen house, nel mese di maggio durante lo sviluppo vegeto-riproduttivo. Media e deviazione standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

4.3 SPERIMENTAZIONE 2: Nuove linee FT1 della cv. Romina

La prova di trasformazione genetica, sulla cv. Romina, è stata mediata da *Agrobacterium tumefaciens* esprime il costrutto 35S::FT1. Questa, è stata svolta su un totale di 210 foglioline (espanti), numerate e divise in 21 microbox, ciascuna contenente 10 espanti, numerati secondo l'ordine rappresentato in *Figura 11*. I dati sono stati raccolti al termine del periodo di buio (3 settimane dalla fase di infezione, T0), sul terreno di selezione e rigenerazione (LRMS), ogni 4 settimane, fino alla dodicesima settimana. Parallelamente alla raccolta dati, venivano eseguite le operazioni di trasferimento degli espanti, su terreni di coltura freschi a cadenza bisettimanale, sempre su terreno LMRS, andando a visualizzare con filtro GFP gli espanti più interessanti. Il procedimento è stato ripetuto fino all'emissione dei primi germogli. Fin dal primo rilievo visivo della GFP, eseguito durante il primo trasferimento (2 settimane dal T0), sono stati rilevati anche se in numero ridotto, i primi eventi di caulogenesi; tutti gli espanti presentavano ancora porzioni di tessuto vitale (*Figura 15*).



Figura 55: Espanti su terreno LMRS, a 2 settimane dall'esposizione alla luce.

A partire dalla prima raccolta dati (4 settimane dal T0), si sono iniziati a osservare i primi eventi di trasformazione stabile e accrescimento del callo meristematico. Alcuni

espianti si presentavano del tutto necrotici, anche se era stato indotto il processo di differenziazione e formazione del callo. Questo accadeva grazie all'azione selettiva dell'antibiotico kanamicina monosolfato, aggiunta al terreno nella concentrazione di 10 mg/L. Al primo rilievo (4 settimane dal T0) la percentuale di calli che presentavano l'espressione della GFP, sul totale dei 210 espanti, era del 40,5%, come possiamo osservare nel *Grafico 18*. In media, a 4 settimane dal T0, sono stati rilevati 0,6 calli esprimenti GFP per espanto, come riportato nel *Grafico 19*.

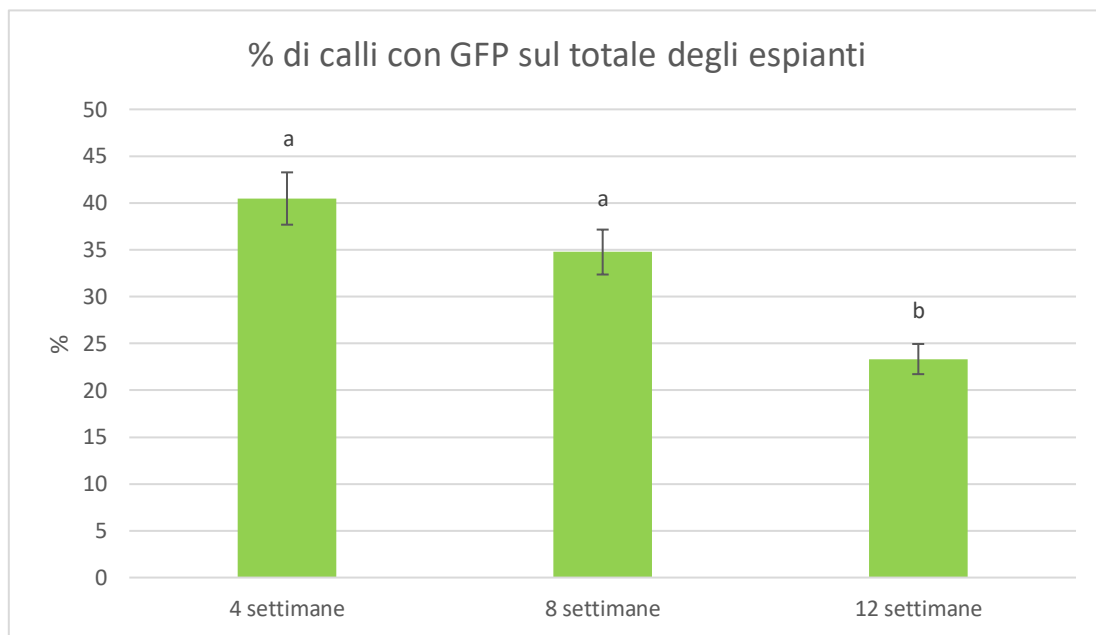


Grafico 18: % di calli che esprimevano GFP, sul totale degli espanti (210). Il parametro è stato analizzato a distanza temporale di 4 settimane dal T0, per evidenziare il numero di nuovi eventi morfogenetici avvenuti a partire dal tempo 0. Media e errore standard, minime differenze significative calcolate con il metodo SNK $p \leq 0,05$.

Naturalmente, durante il trasferimento sul terreno fresco, a partire dal primo rilievo (4 settimane dal T0), venivano selezionati e trasferiti esclusivamente gli espanti che presentavano ancora porzioni di tessuto vitale e in grado di rigenerare o presentavano le prime formazioni di callo meristemato (*Figura 16*).

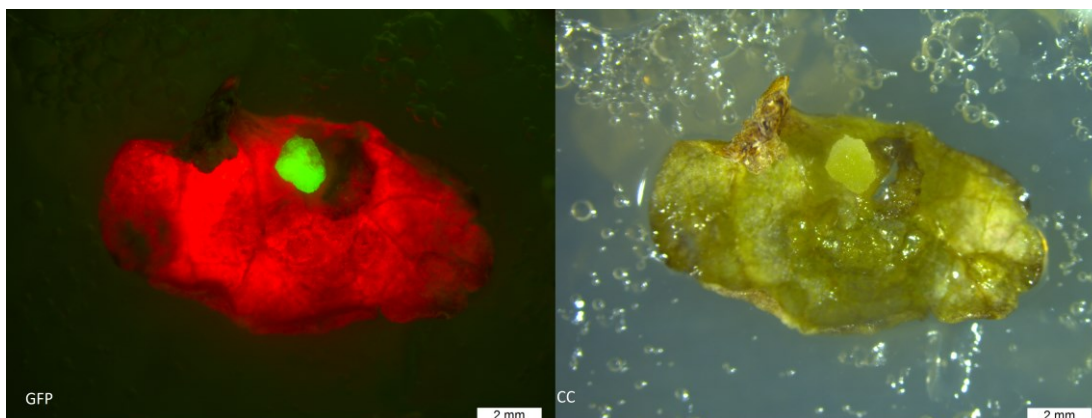


Figura 16: Fotografia di un espianto, con la presenza di callo meristemico fluorescente, indicatore di trasformazione stabile. Scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 4 settimane dal T0. A sinistra lo scatto con filtro GFP e a destra lo scatto in campo chiaro (CC)..

A 8 settimane dal T0, l'effetto della selezione con kanamicina si è mostrato più marcato e la maggior parte dei calli che presentavano debole presenza di GFP, stentata crescita o assenza di GFP, sono degenerati e/o necrotizzati. Questi ultimi sono stati rimossi in quanto non più vitali e impossibilitati a generare nuovi processi di differenziazione. Andando ad analizzare i dati, si è notato il decremento del numero di calli esprimenti GFP, ad effetto dell'agente selettivo (kanamicina monosolfato). Il numero medio di calli con GFP, per espianto, risulta diminuire a 0,5 (*Grafico 19*). La percentuale di calli con GFP, sul totale degli espianti (210), scende a 34,8% (*Grafico 17*); questo è dovuto oltre che, alla selezione con kanamicina, alla comparsa di contaminazioni all'interno di una microbox. In totale sono stati persi 10 espianti. In compenso i calli vitali, esprimenti GFP, continuavano a proliferare ed accrescersi (*Figura 17*).

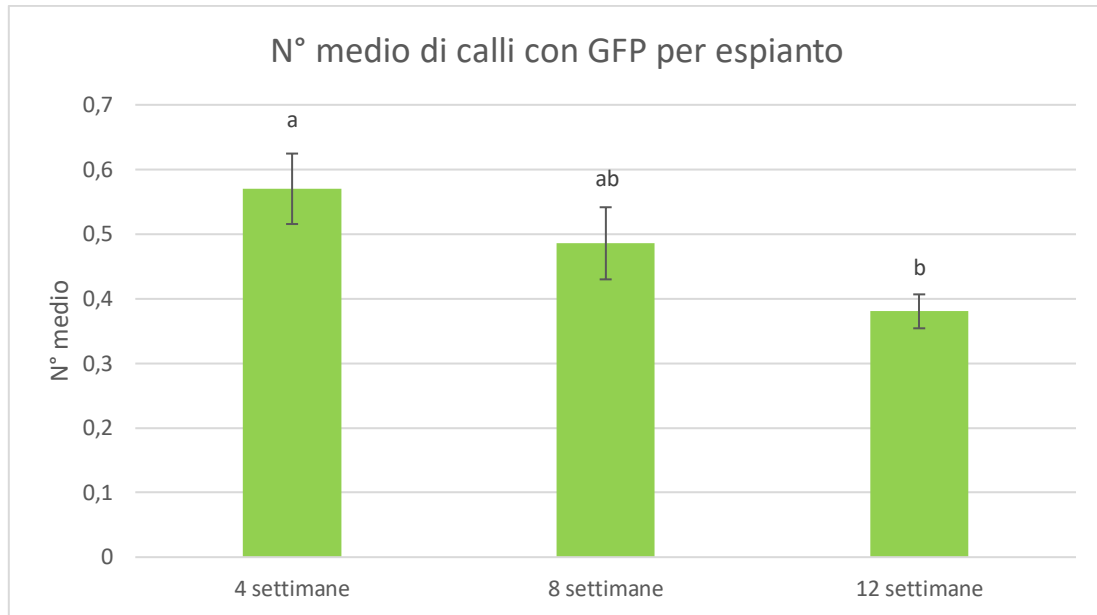


Grafico 19: numero medio di calli che esprimevano GFP, per ogni singolo espianto. Il parametro è stato analizzato a distanza temporale di 4 settimane, per evidenziare il numero di nuovi eventi morfogenetici avvenuti a partire dal tempo 0.

Sempre a 8 settimane dal T0, nonostante l'efficiente azione dell'antibiotico di selezione, è stato possibile osservare la presenza di calli che non esprimevano GFP. Questi, infatti, sono calli *Escape* cioè, calli resistenti all'agente selettivo (kanamicina monosolfato) e non esprimenti il transgene.. I calli *Escape* sono stati trasferiti, insieme ai calli con GFP, fino all'ottenimento di 2 germogli, generatisi da espianti differenti, da utilizzare come linee di controllo nella fase successiva di caratterizzazione fenotipica.

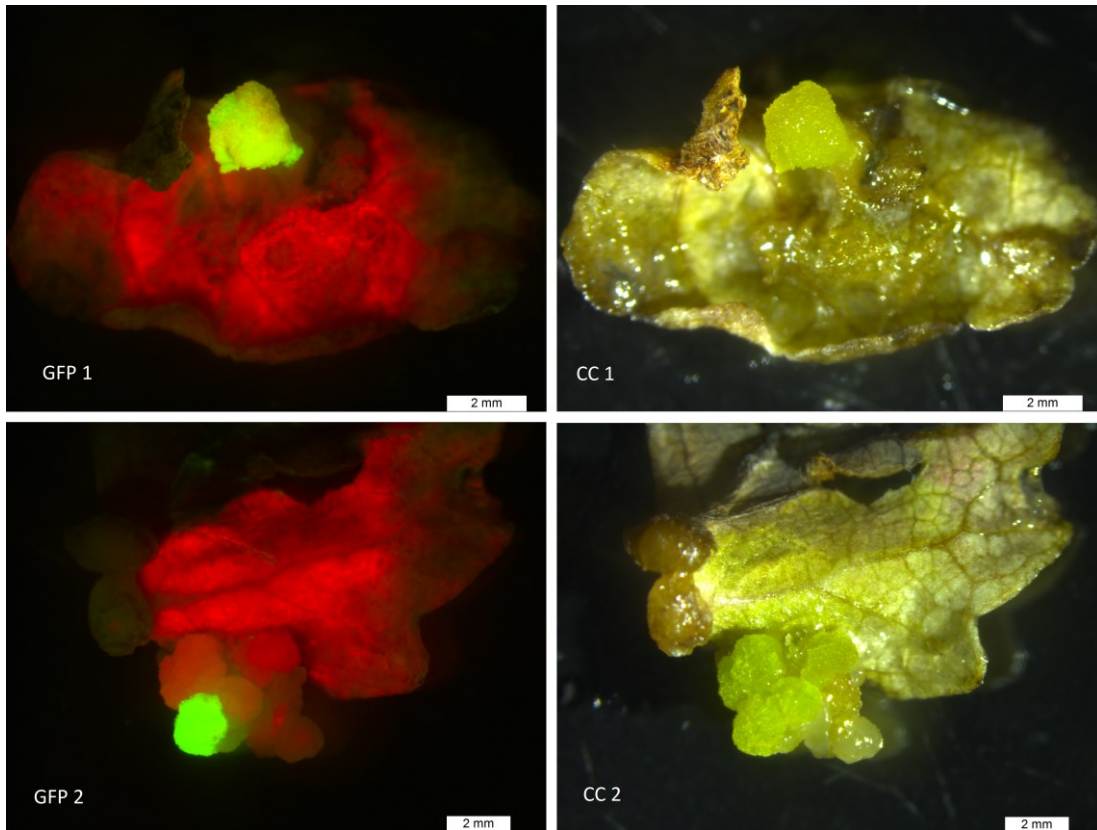


Figura 17: Fotografia di 2 espianti, esprimenti GFP. Le due foto in alto (GFP 1-CC 1) sono state scattate al medesimo espianto, fotografato a 4 settimane dal T0. Le due foto in basso (GFP 2-CC 1) sono state scattate ad un nuovo callo esprimente GFP. Scattate con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 8 settimane dal T0. A sinistra lo scatto con filtro GFP e a destra lo scatto in campo chiaro (CC).

Il terzo rilievo dei dati è stato effettuato a 12 settimane dal T0; A questo punto, la pressione selettiva dell'antibiotico, porta alla necrosi della maggior parte degli espianti che non hanno subito processi di trasformazione, ad esclusione di pochi calli *Escape* (Figura 18).



Figura 18: Fotografia di un espianto, che presenta 2 calli meristematici; quello in basso esprime GFP, quello in alto (rosso), non esprime GFP, quindi è un callo Escape. La foto è stata scattata, a 12 settimane dal T0, con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS. A sinistra lo scatto con filtro GFP e a destra lo scatto in campo chiaro (CC)..

A 12 settimane dal T0, il numero medio di calli con GFP, per espianto, è 0,4 e la percentuale di calli, esprimenti GFP, è scesa al 23,3% (Grafico 18 e Grafico 19). Parametri che sono nella norma in processi di trasformazione, dove l'obiettivo principale è quello di selezionare e mantenere vitali solo quegli espianti che presentano eventi di trasformazione genetica stabile (Figura 19).

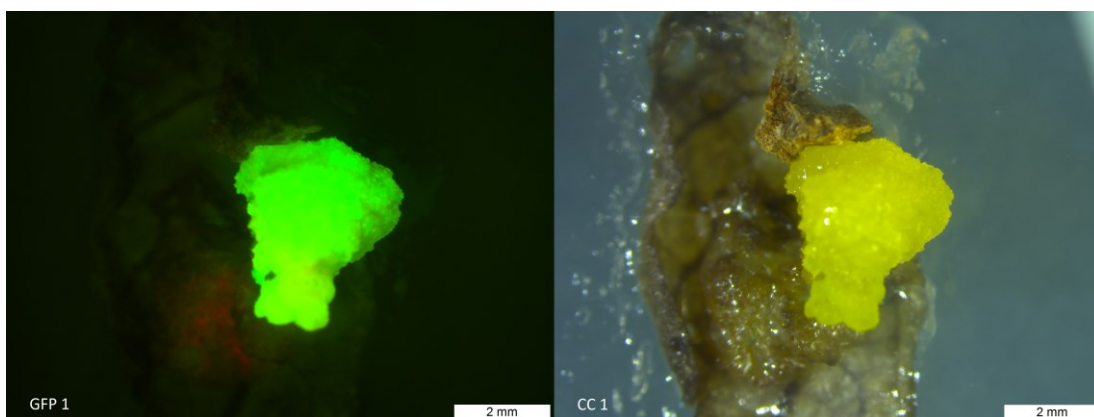


Figura 19: La foto in alto (GFP 1-CC 1) è stata scattata al medesimo espianto, fotografato a 4 e a 8 settimane dal T0. La fotografia è stata, scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 10 settimane dal T0, durante il trasferimento degli espianti. A sinistra lo scatto con filtro GFP e a destra lo scatto in campo chiaro (CC).

Alla fine del terzo e ultimo rilievo dati, a 12 settimane dal T0, è stato possibile osservare un elevato tenore di proliferazione dei calli meristematici GM. Durante il trasferimento sono state selezionate allo stereoscopio, con filtro GFP, 2 linee *Escape*, andando a scegliere 2 calli, derivanti da 2 linee distinte (nate da espianti differenti),

vitali e ben sviluppati (*Figura 20*), da utilizzare come controlli nella fase di caratterizzazione. I restanti calli *Escape* sono stati eliminati.

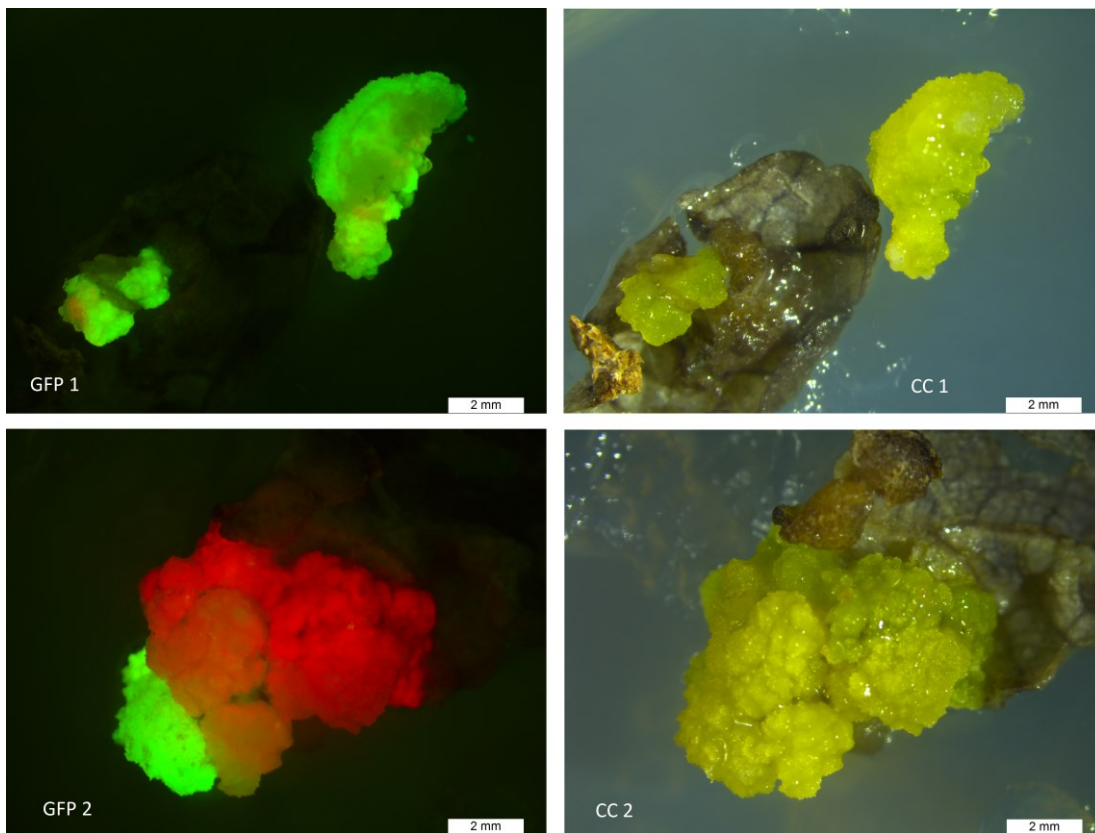


Figura 20: Fotografia di 2 espunti, esperimenti GFP. La fotografia in alto (GFP 1-CC 1) è stata scattata al medesimo espunto, fotografato, precedentemente, a 4, 8 e 10 settimane dal T0; la fotografia in basso (GFP 2-CC2) è stata scattata anch'essa allo stesso callo riportato a 4 settimane da T0, esposto in Figura 13. Fotografia scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 12 settimane dal T0. A destra lo scatto in campo chiaro (CC) e a sinistra lo scatto con filtro GFP.

Successivamente alle 12 settimane, non sono più stati effettuati rilievi, ma comunque è stata sempre monitorata la presenza di GFP, lo sviluppo di nuovi calli e/o la differenziazione di germogli dai calli già esistenti. Durante i trasferimenti, su mezzi di coltura freschi (LMRS), a 14 settimane dal T0, è stato possibile visualizzare l'accrescimento dei calli meristematici GM, già presenti (*Figura 21*).

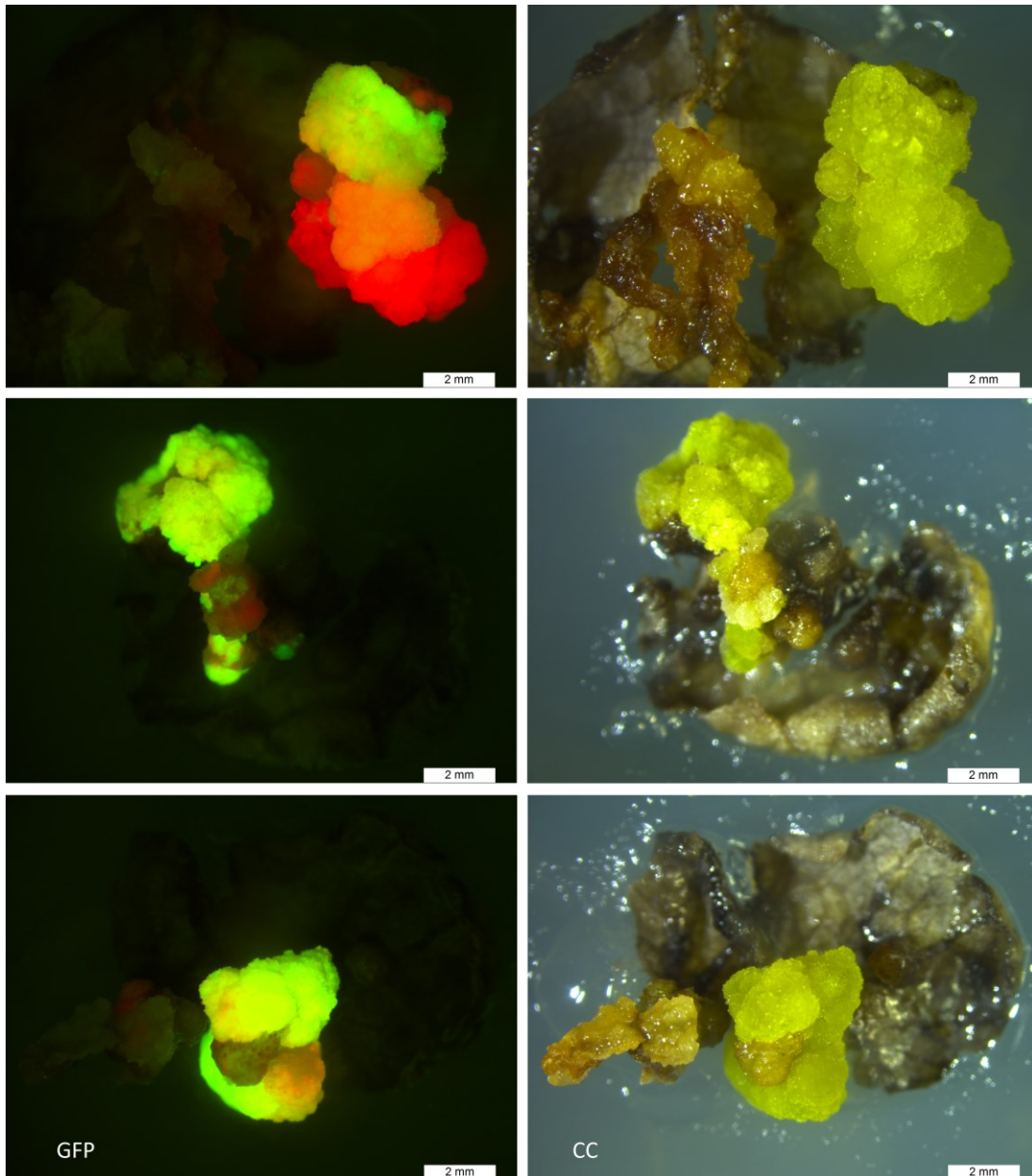


Figura 21: Fotografia di altri 3 espianti, con calli esprimenti GFP, scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 14 settimane dal T0. A destra lo scatto in campo chiaro (CC) e a sinistra lo scatto con filtro GFP.

Il primo germoglio GM è stato osservato a 18 settimane dal T0 (Figura 22). Questo, dopo essere stato trasferito per 2 volte (quindi 4 settimane) sul terreno LMRS è stato spostato sul terreno di allungamento (BA 0.25 mg/L) in tubo di vetro, come in Figura 12, sempre con l'aggiunta degli antibiotici kanamicina monosolfato (10 mg/L) e cefotaxime (200 mg/L).

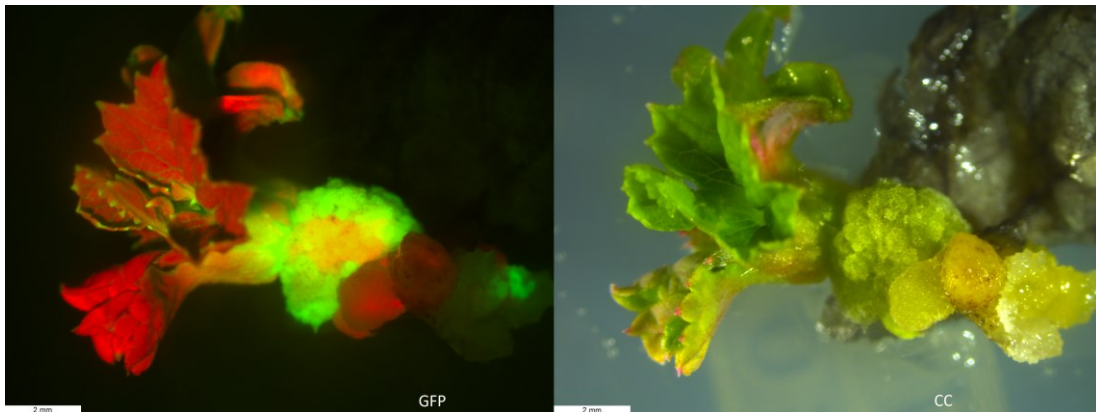


Figura 22: 1° Germoglio GM, esprime GFP. Scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 18 settimane dal T0. A destra lo scatto in campo chiaro (CC) e a sinistra lo scatto con filtro GFP.

A 26 settimane dal T0, i 2 calli Escape insieme a un callo GFP, hanno differenziato il primordio di un germoglio (Figura 23). Anche questi, sono stati trasferiti per 2 volte, sul terreno di selezione e rigenerazione per poi essere spostati sul terreno di proliferazione (BA 0.25 mg/L).

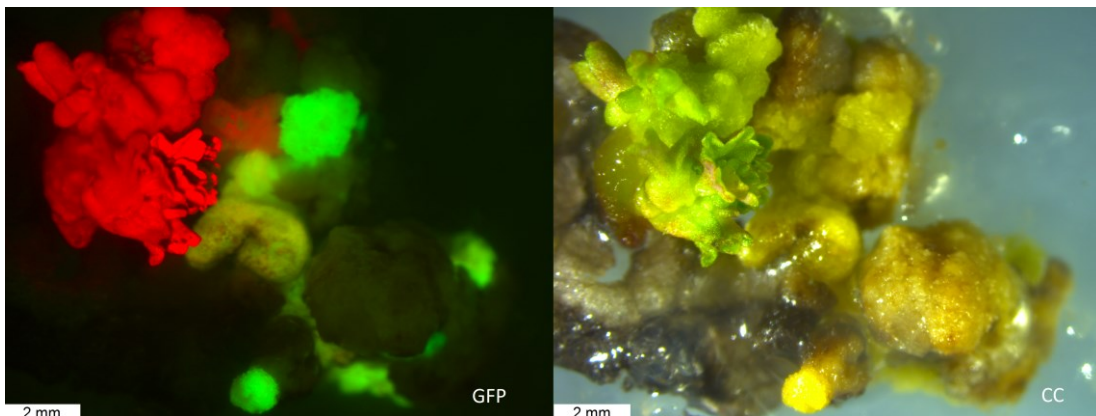


Figura 6: Fotografia di uno dei 2 germogli Escape. Scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su terreno LMRS, a 26 settimane dal T0. Sulla base di esso possiamo notare delle formazioni callose esprimenti GFP. A destra lo scatto in campo chiaro (CC) e a sinistra lo scatto con filtro GFP.

Nelle settimane seguenti sono state ottenute altre linee GM; la terza linea è comparsa subito dopo, a 28 settimane da T0. Tutti i germogli ottenuti, compresi gli *Escape*, sono stati trasferiti in proliferazione e infine in allungamento, con l'obiettivo di ottenere cloni micropropagati delle diverse linee, da caratterizzare fenotipicamente. Tutte le procedure di trasferimento degli espianti e dei germogli sono state effettuate a cadenza bisettimanale, fino all'ambientamento delle linee ottenute, fatto a 56 settimane dal T0.

In totale sono stati ottenuti 10 germogli GM, appartenenti a 6 linee indipendenti; alcuni espianti hanno portato alla rigenerazione di più di un germoglio. Questi germogli non potranno essere definiti genotipicamente differenti, finché non sarà fatta una caratterizzazione molecolare (Southern blot) che, potrebbe caratterizzarli come cloni differenziati dallo stesso evento di trasformazione o al contrario come linee indipendenti. A 56 settimane dal T0, l'efficienza di trasformazione, intesa come numero di linee indipendenti GM ottenute, sul totale degli espianti (210), è stata del 2,9 % (Grafico 20).



Grafico 20: Efficienza di trasformazione, espressa come, linee indipendenti geneticamente modificate, ottenute sul totale di 210 espianti, utilizzati nella sperimentazione, a 56 settimane dal T0. Valore espresso in percentuale.

Delle linee indipendenti ottenute, ne sono state selezionate 3 per l'ambientamento (Romina FT1 A, FT1 B e FT1 C), insieme ad una linea Wild Type, per poter effettuare una prima valutazione fenotipica, in screen-house.

4.4 SPERIMENTAZIONE 3: Analisi segregazione del gene *FT1* in popolazioni d'incrocio mediante valutazione fenotipica

Durante la valutazione visiva dei semenzali, si è potuta osservare fin da subito, la presenza di individui che presentavano fiori. Sul totale di 112 semenzali, gli individui con almeno un fiore sono risultati essere 88 (*Tabella 2*).

Semenzale	Parentale Femminile		Parentale Maschile	N° semenzali ottenuti	N° semenzali con infiorescenze	N° Cartellini
AN17,51	<i>Rociera</i>	X	FT1A	14	4	51-54
AN17,52	<i>Rociera</i>	X	FT1B	54	47	51-90
AN17,53	<i>Rociera</i>	X	FT1D	44	37	51-81
TOTALE				112	88	

Tabella 2: Numero di semenzali ottenuti per combinazioni d'incrocio e numero di semenzali che hanno espresso il fenotipo FT1.

La percentuale di semenzali che portavano fiori, quindi, è risultata essere il 79%; di questi, solo il 6% non esprimeva GFP, a livello costitutivo, sui diversi organi campionati (*Grafico 21*). Il restante 21% degli individui non portava fiori ma, alcuni di loro, esprimevano comunque fluorescenza sugli organi vegetali. L'incrocio tra la cv. *Rociera* e la linea FT1 A, risulta essere molto interessante poiché, i 4 individui dei 14 semenzali che presentavano delle infiorescenze, non esprimevano GFP in nessuno degli organi campionati. Questo ci ha indotto a pensare che probabilmente, in questo incrocio ci sia stato un maggiore tasso di riarrangiamento delle sequenze codificanti del costrutto. La segregazione, nella maggior parte degli individui, sembra non aver portato a un riarrangiamento delle diverse cassette geniche del costrutto 35S::FT1; infatti, quasi tutti i semenzali che presentavano fiori esprimevano anche la proteina GFP. Il restante 6 % dei semenzali con fiori ma non esprimenti il gene reporter, mostravano un habitus differente dagli individui con fiori ed esprimenti GFP; questi ultimi presentavano un habitus simile alle linee della cv. *Sveva FT1* (A, B e C), esprimendo un minore rigoglio vegetativo, una dimensione delle foglioline (FG) ridotta e la presenza di un numero maggiore di assi fiorali allungati (più alti), come è possibile osservare in *Figura 24*.

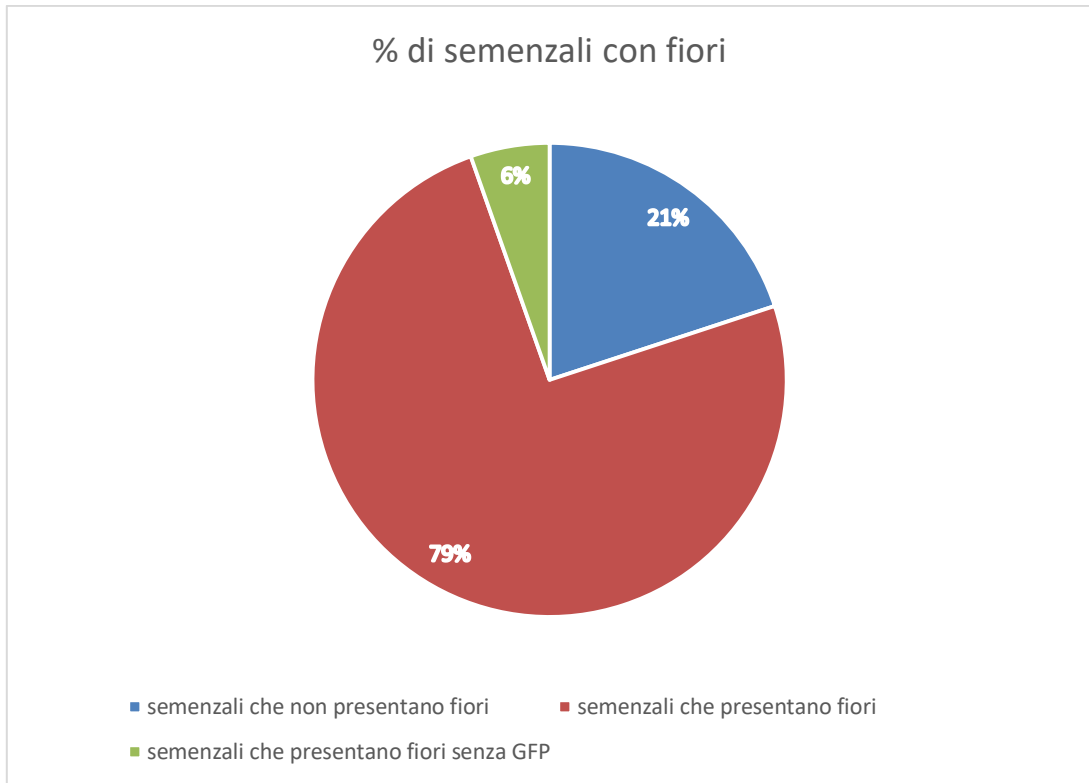


Grafico 21: Rappresentazione grafica della percentuale di semenzali che mostravano fiori sul totale degli individui, della percentuale di semenzali con fiori senza espressione della GFP, e della percentuale di semenzali che non hanno sviluppato fiori.

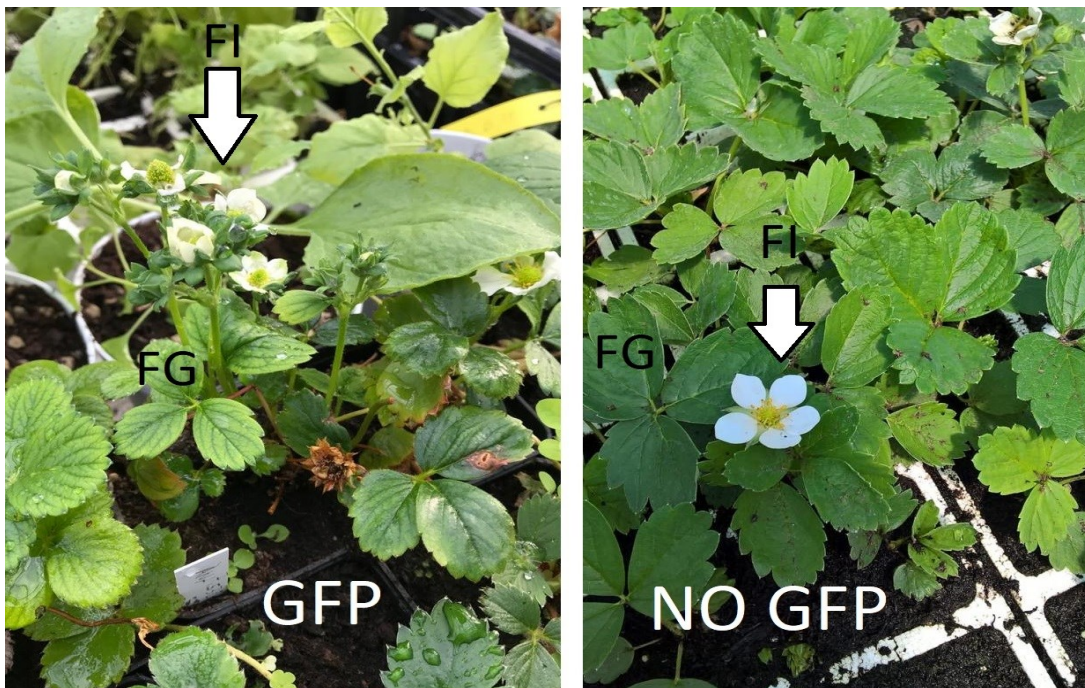


Figura 24: Esempio a confronto di 2 semenzali, portanti fiori (FI), quello a sinistra esprime GFP e quello a destra senza GFP.

5. DISCUSSIONI

5.1 SPERIMENTAZIONE 1: Caratterizzazione fenotipica delle linee di fragola FT1 e FT2 cv. Sveva

Dall'analisi statistica dei risultati è emerso che le 3 linee trasformate con il gene *FT2* (F1G1, F3G1 e F3G2), in confronto al controllo Wild Type, hanno espresso un elevato rigoglio vegetativo, sia in termini di dimensione degli organi vegetanti delle piante, che in termini di produzione di questi (foglie e stoloni) (*Figura 25*).



Figura 25: Confronto tra le linee FT2, a sinistra, e il rispettivo controllo Wild Type, a destra.

Le linee FT1 (A, B, C e D) invece, risultano avere un rigoglio vegetativo nettamente inferiore ai controlli Escape e WT, presentando organi vegetanti di dimensioni ridotte e in numero inferiore. Le linee FT2 hanno espresso, per tutta la stagione vegeto-riproduttiva (maggio, giugno, luglio), differenze significative, sia per i parametri di altezza della pianta, altezza del picciolo fogliare, altezza della fogliolina centrale e

larghezza della fogliolina centrale, sia per i parametri numero di foglie per pianta, numero di stoloni e numero di infiorescenze. Il numero di infiorescenze, rispetto al controllo Wild Type, è risultato essere significativamente inferiore; le 3 linee trasformate hanno infatti prodotto un numero di infiorescenze 8 volte inferiore al controllo nel mese di maggio (fase riproduttiva di Sveva). L'espressione costitutiva, del gene FT2, sembra aver spostato l'equilibrio vegeto-riproduttivo delle tre linee transgeniche verso la modalità di riproduzione agamica/vegetativa; infatti, in concomitanza della diminuzione di produzione delle infiorescenze, si è vista la maggiore produzione di stoloni e foglie rispetto al controllo anche durante la fase riproduttiva. Le linee FT2, dall'analisi dei dati raccolti a ottobre, sembrano invece uniformarsi al controllo Wild Type, per quanto riguarda i parametri di altezza della pianta, altezza del picciolo e altezza e larghezza della fogliolina centrale. Mentre, i parametri del numero di stoloni e foglie prodotte rimangono nettamente superiori ai controlli; in particolare, il numero di foglie, per ogni linea FT2, risulta aumentare di 1,6 volte, in media, rispetto ai dati raccolti per ciascuna linea durante la stagione estiva (F1G1, la linea che ha prodotto più foglie, 33 a luglio e 53 a ottobre), e di 2,4 rispetto al dato raccolto nel medesimo mese per il controllo (Wild Type, 22 foglie a ottobre). Questo potrebbe indicare che le linee FT2 non siano entrate in stasi vegetativa, almeno per quanto riguarda la produzione di stoloni e di foglie, che è continuata per tutta la stagione estiva fino ad ottobre. Nelle 4 linee FT1, invece, l'equilibrio vegeto-riproduttivo sembra essere spostato verso la produzione di infiorescenze e quindi alla riproduzione sessuale, tale considerazione si basa sui parametri biometrici rilevati nel mese di maggio, che forniscono risultati significativamente differenti rispetto ai controlli Escape e Wild Type. Le linee FT1, ad eccezione della FT1D, risultano avere un'altezza minore, una minore lunghezza del picciolo fogliare, una minore dimensione delle foglioline centrali e un minor numero di foglie. Contemporaneamente, la produzione di stoloni risulta essere nulla, rispetto ai controlli; mentre la produzione di fiori e frutti maturi, nel periodo del rilievo (maggio), che coincide con la fioritura, è risultata essere significativamente maggiore nelle linee FT1A e FT1C. Altro risultato interessante è il numero di germogli per pianta, parametro risultato significativamente inferiore per le linee FT1B e FT1C, rispetto alle linee FT1A e FT1D che, invece, risultava paragonabile ai controlli. Da questi risultati si può ipotizzare che, il costrutto

genico 35S::FT1 abbia influito sulla fisiologia della pianta, spostando l'equilibrio vegeto-riproduttivo, degli individui trasformati, verso la riproduzione sessuale anziché agamica (assenza di produzione di stoloni). Si è visto che, rispetto ai controlli, alcune linee FT1 mostrano precocemente frutti maturi. Infatti, anche se il numero di germogli per le linee FT1A e FT1D era simile ai controlli, questi probabilmente, durante lo sviluppo, differenzieranno un maggior numero di infiorescenze rispetto ai controlli WT e Escape che, invece, differenzieranno un maggior numero di organi vegetanti (foglie, stoloni).

5.2 SPERIMENTAZIONE 2: Trasformazione della cv. Romina con il gene *FT1*

Dai risultati ottenuti, a 56 settimane dal T0, possiamo notare come il processo di organogenesi degli espianti utilizzati abbia avuto una lenta evoluzione nel tempo. Infatti, non sono da escludere difficoltà di formazione dei germogli per effetti del genotipo, della cv. Romina, sull'efficienza di trasformazione; perché, quest'ultima è genotipo-dipendente (Sabbadini *et al.*, 2019). Oppure per effetti negativi dei regolatori di crescita impiegati o di altri componenti del mezzo di coltura, visto che prove precedenti di rigenerazione, riguardanti la cultivar Sveva (Cappelletti *et al.*, 2015), avevano dato percentuali di formazione di callo elevate (98%) e una media di germogli rigenerati per ogni foglia più elevato (10,3) rispetto alla cv. Romina, che ha dato una percentuale di calli del 23,3% e un numero medio di calli ottenuti per espianto, nettamente inferiore (0,4), a 12 settimane dal T0 (*Grafico 18* e *Grafico 19*). Durante il periodo di selezione e rigenerazione, è emerso che uno stock di MS, utilizzato per il trasferimento degli espianti a 12 settimane dal T0, era tossico. Per accertarsi della sua tossicità, sono state fatte delle prove di rigenerazione su altre cv. e altre specie, su queste ha rallentato e/o bloccato i processi di organogenesi; infatti, nella preparazione dei successivi terreni di allungamento e selezione e rigenerazione, l'MS è stato rimpiazzato da soluzioni stock, a concentrazione nota, di macroelementi, microelementi e vitamine. Probabilmente anche questo ha influito sulla velocità di rigenerazione e differenziazione di germogli. Confrontando i risultati ottenuti dalla prova di trasformazione genetica, della cv. Romina, con quelli di autori precedenti in

fragola coltivata ottoploide, si nota che per avere una media di germogli rigenerati/foglia pari a quella ottenuta da Zhao *et al.*, (2004), di 0,104 germogli rigenerati/foglia nella cv. "Hecker" e 0,074 germogli rigenerati/foglia nella cv. La Sans Rivale, si devono attendere da 20 a 26 settimane dall'inizio della prova; risultato temporalmente sovrapponibile alla nostra prova per l'ottenimento del primo germoglio (ottenuto a 26 settimane da T0). L'organogenesi dei successivi germogli, nella nostra prova, è avvenuta successivamente alla ventiseiesima settimana. Questo ritardo probabilmente, è da imputare alla difficoltà di rigenerazione e differenziazione degli espianti a 12 settimane da T0, dove è stato utilizzato lo stock di MS tossico. Nelle successive fasi di allungamento e radicazione, si è visto un repentino sviluppo dei germogli e una stabilizzazione dei caratteri fenotipici. A 38 settimane dal T0 è stata possibile osservare l'emissione di fiori, in vitro, su 2 linee trasformate, poste in vasi di vetro, su terreno di radicazione MS0 (Figura 26).



Figura 26: Particolare di un germoglio, proveniente da una linea GM, che porta un fiore. Foto scattata in vaso di vetro su terreno di radicazione MS0, a 36 settimane dal T0.

Alla comparsa dei fiori, sui germogli delle linee GM, è stata fatto un rilievo della GFP, allo stereomicroscopio con apposito filtro, per osservare l'espressione del transgene

sugli organi fiorali appena differenziati (*Figura 27*). A 40 settimane dal T0 quindi, 4 settimane dopo la comparsa dei fiori, il clone della prima linea GM che ha emesso fiori, è riuscito a portare a termine il processo di allegazione su di un fiore, il quale, è andato incontro a fruttificazione prematura (*Figura 27*). La comparsa di fiori, l'allegazione e la successiva fruttificazione, avvenuti sul germoglio appena radicato, in condizioni fisiologiche normali non sarebbero mai potute avvenire, come è stato possibile osservare sulle 2 linee Escape ottenute. In vitro non si era mai osservato nemmeno lo sviluppo e la maturazione di un frutto, neanche in lavori precedenti su Sveva FT1. Questo perché il giovane germoglio non sarebbe stato in grado di sostenere lo sviluppo del ricettacolo florale in condizioni fisiologiche normali e quindi, avrebbe bloccato l'espressione dei geni che codificano per l'induzione a fiore dei meristemi ascellari.



Figura 27: fotografie di un germoglio, proveniente da una linea GM, che porta un fiore a sinistra e di un germoglio, portante un frutticino in accrescimento, a destra. Foto scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, su piastra Petri, fuori dal terreno di coltura, a 38 e 40 settimane dal T0.

Tutti gli organi fiorali prodotti dalle linee GM esprimevano GFP, quindi, i cloni risultavano essere trasformati e stabili con il costrutto 35S::FT1 (*Figura 28*).

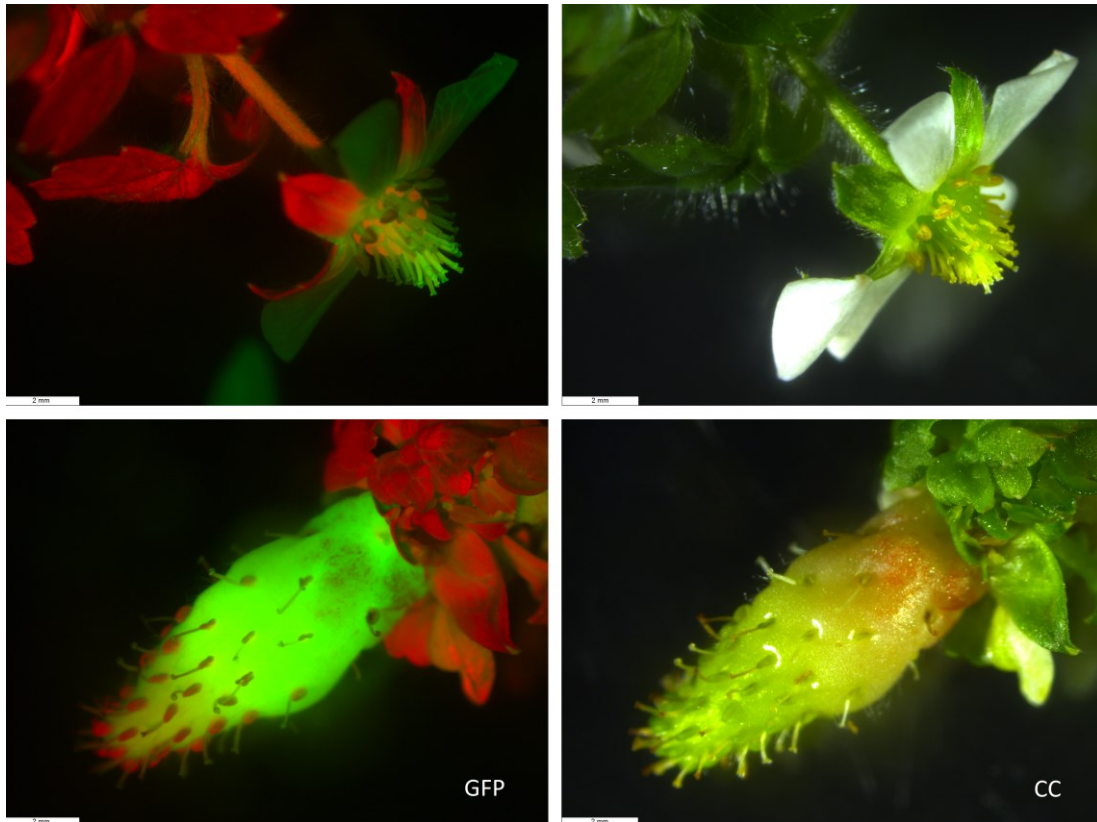


Figura 28: Particolare di fiore e frutto, appena allegato, in una linea GM ottenuta dal protocollo di trasformazione con il costrutto 35S::FT1. Scattata con fotocamera Leica DFC 450 C, a 40 settimane dal T0. A sinistra lo scatto con filtro GFP e a destra lo scatto in campo chiaro (CC).

A 48 settimane dal T0, le prime 3 linee GM ottenute, risultavano mantenere stabilmente i caratteri fenotipici indotti dalla trasformazione. Alcuni cloni mostravano lo sviluppo di diversi germogli, fiori e frutticini, alcuni dei quali, arrivati anche a maturazione (*Figura 29*).



Figura 29: Fotografia di una delle 3 linee GM, ottenute, in vaso con MS0. Scattata a 48 settimane da T0. Si può osservare la presenza di fiori, in via di sviluppo e fiori che hanno iniziato ad ingrossare il ricettacolo florale.

I cloni suddetti, messi a confronto con i cloni delle linee Wild Type e *Escape*, già dalla coltura in vitro, presentavano differenze morfologiche visibili; i controlli non trasformati presentavano un portamento eretto e longilineo, tipico fenotipo di piantine, della specie *Fragaria x ananassa* micropropagate; inoltre, nessuno dei cloni delle due linee *Escape* così come i Wild Type, mostrava la formazione di fiori. I cloni delle linee GM, soprattutto gli individui che portavano fiori e frutti, presentavano un habitus compatto, con una lunghezza degli organi vegetanti ridotta e i fiori sviluppatissimi

singolarmente sugli assi fiorali, eretti al di sopra delle foglie (*Figura 30*).



Figura 30: Confronto tra 2 diverse linee rigenerate, Escape a sinistra e GM-FT1 a destra, su terreno MS0. A destra è possibile osservare la presenza di un frutticino, arrivato a maturazione, portato dal clone della linea GM. Il frutticino, anche se arrivato a maturazione, si presenta disforme e con filloidia.

Al termine della sperimentazione, sono state selezionate casualmente tre linee transgeniche, rigenerate da tre espianti differenti (indipendenti) per l'ambientamento ed una linea Wild Type, di controllo. In totale sono state ambientate 15 piante per linea, da utilizzare per la successiva caratterizzazione fenotipica e molecolare. Già a 3 settimane dalla fase di ambientamento, le 3 linee GM acclimatate (Romina FT1A, Romina FT1B, Romina FT1C), mostravano un diverso habitus rispetto al controllo e portavano fiori singoli sugli assi delle infiorescenze (*Figura 32*).

5.3 SPERIMENTAZIONE 3: Segregazione del costrutto 35S::FT1 in popolazioni di semenzali da *Rociera x Sveva FT1*

La poliploidia di *Fragaria x ananassa* provoca un effetto additivo cromosomico nella segregazione, e determina un aumento del numero di possibili diversi fenotipi e un aumento della diversità allelica, con maggiori possibilità di combinazioni alleliche. Nella valutazione dei semenzali si è potuto osservare come il costrutto 35S::FT1 non abbia subito un forte riarrangiamento e un assortimento indipendente delle diverse sequenze codificanti. Infatti, la maggior parte dei semenzali che portava fiori, esprimeva GFP su tutti gli organi campionati, grazie al promotore costitutivo (35S). Per i pochi individui portanti fiori, che non esprimevano GFP, la segregazione delle sequenze codificanti del costrutto, potrebbero aver subito un riarrangiamento casuale, perdendo la sequenza codificante per la produzione della GFP (Transgene). Per accertare l'avvenuto riarrangiamento delle cassette geniche del 35S::FT1 sarebbe stato opportuno svolgere analisi molecolari approfondite, come analisi PCR o Southern blot, per rilevare la presenza delle specifiche sequenze codificanti, proprie del costrutto.

6. CONCLUSIONI

Dalla caratterizzazione fenotipica, delle linee FT1 e FT2, della cv. *Sveva*, è emerso che le linee trasformate, confrontate con i rispettivi controlli, presentano notevoli differenze morfologiche. Le FT2, rispetto alle Wild Type, sembrano essere svincolate dal fotoperiodo. I meristemi ascellari di queste, continuano lo sviluppo vegetativo anche nelle fasi fenologiche di induzione a fiore, fioritura, allegagione, ingrossamento dei ricettacoli, stasi vegetativa (estiva) e ingresso in dormienza. Nel mese di maggio, il numero di infiorescenze prodotto dalle 3 linee trasformate è pressoché nullo, confrontato con il numero medio di infiorescenze prodotto dai cloni Wild Type. Si ipotizza che le piante appartenenti alle linee FT2 possano avere una maggiore efficienza fotosintetica, grazie al loro elevato vigore vegetativo. Le 4 linee trasformate FT1, invece, sembrano avere diverso habitus, sia tra le linee trasformate stesse, che tra le linee GM e i controlli (*Escape* e Wild Type). Come possiamo osservare nella *Figura 31*, le linee A e B presentano un habitus vegetativo compatto semi eretto, con molte infiorescenze ramificate, portanti un singolo fiore per ramificazione dell'asse principale dell'infiorescenza. La linea FT1 C, presenta un habitus compatto e eretto, con ridotto vigore. Infine, la linea FT1 D, rispetto ai controlli che portano un numero medio di fiori significativamente inferiore e sono caratterizzati da un habitus espanso, è risultata essere molto vigorosa, con un habitus compatto e eretto. Questa linea ha espresso un elevato numero medio di fiori, non significativamente inferiore alla FT1 A ma, allo stesso tempo, ha differenziato un maggior numero di foglie (dato medio non significativamente inferiore ai controlli, *Escape* e WT); questi risultati inducono a credere che, quest'ultima linea, abbia un miglior equilibrio vegeto-riproduttivo.

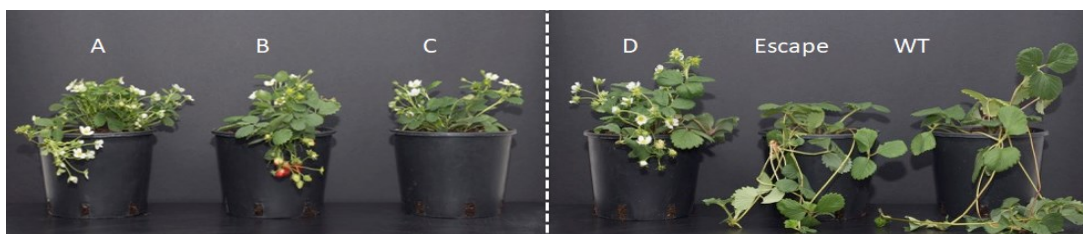


Figura 31: Linee FT1 A, FT1 B, FT1 C, FT1 D della cv. Sveva, messe a confronto con i relativi controlli Escape e Wild Type.

La messa a punto del protocollo di trasformazione, sulla cv. Romina, è avvenuta con successo, ottenendo un'efficienza di trasformazione del 2,9%, intesa come linee GM, considerate indipendenti, sul totale degli espianti utilizzati. In totale, a 56 settimane dal momento in cui gli espianti sono stati esposti alla luce sul terreno di selezione e rigenerazione, sono state ottenute 6 linee GM indipendenti; di queste ne sono state selezionate 3, ambientate con successo insieme a un controllo Wild Type. Queste linee GM, fin dalle prime settimane di acclimatamento, in screen house, hanno mostrato caratteristiche fenotipiche riconoscibili nelle linee FT1 della cv. Seva, caratterizzate nella precedente sperimentazione (Figura 31).

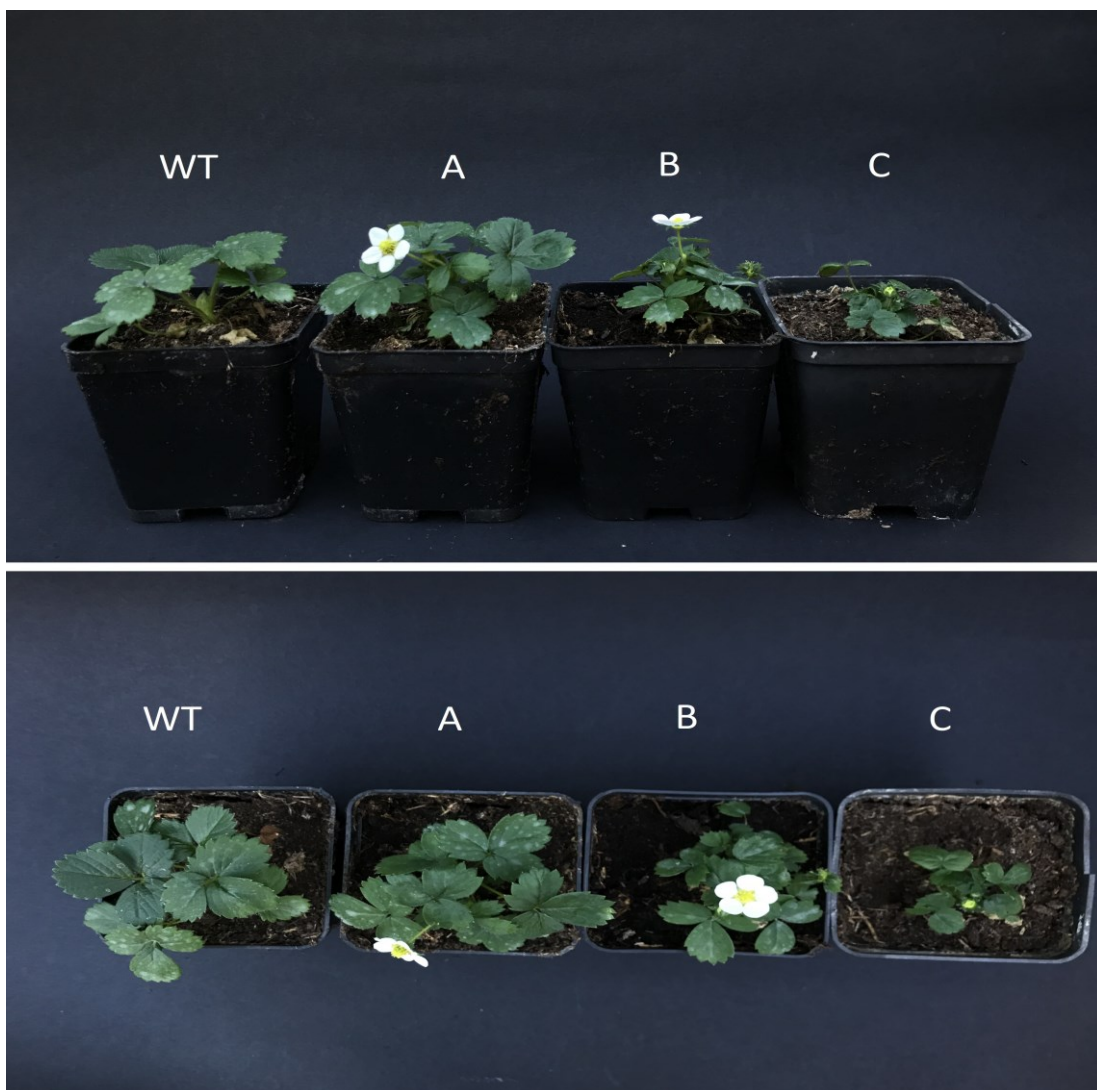


Figura 32: Linee della cv. Romina, FT1 A, FT1 B, FT1 C, messe a confronto con il controllo Wild Type (WT). Fotografia scattata a 64 settimane dal T0, in fase di ambientamento.

Come è possibile osservare in *Figura 32*, le linee trasformate della cv. Romina (A, B e C), a 64 settimane dal T0, già hanno iniziato a differenziare i primi fiori; carattere, molto probabilmente, determinato dal gene FT1, utilizzato nella trasformazione genetica, mediata da *Agrobacterium tumefaciens*.

La valutazione dei semenzali non ha fatto altro che validare la nostra tesi sul ruolo del gene FT1 nella fisiologia della specie cioè, la regolazione dell'induzione a fiore nella pianta. Lo studio sulla segregazione indipendente delle sequenze codificanti del costrutto, è stata effettuata con l'utilizzo esclusivo di caratteri fenotipici, poco utili nel valutare il genotipo degli individui più interessanti all'interno della popolazione dei semenzali. In conclusione, si può ipotizzare che il gene *FT1* intervenga nel processo di induzione a fiore della specie. Come è stato dimostrato, anche su *Fragaria vesca*, per il gene *FvFT1*, l'espressione del medesimo gene, in condizioni naturali, è controllata dal fotoperiodo. In condizioni di giorno lungo viene attivato il gene *FvSOCl*, soppressore della sovraespressione del gene *CONSTANS1*, che induce l'espressione di *FvFT1* nei tessuti meristematici, portando la pianta a differenziare infiorescenze (Koskela *et al.*, 2016). Invece il gene *FT2*, come è stato visto nella caratterizzazione fenotipica sembrerebbe avere un ruolo nello sviluppo vegetativo della pianta, inducendo i germogli a differenziare organi vegetanti a sfavore dell'induzione a fiore. Lo studio sempre più dettagliato di questi geni, coinvolti nel controllo dei meccanismi di sviluppo e induzione a fiore, potrà essere utile per l'ottenimento di piante capaci di migliorare la loro adattabilità alla maggior parte degli areali e ai nuovi sistemi di coltivazione. C'è da sottolineare che le conclusioni di questo elaborato di tesi, sono state tratte, solo sulla base di valutazioni fenotipiche e sarebbe stato indubbiamente necessario proseguire lo studio attraverso analisi Southern blot e analisi di espressione molecolare, necessarie per capire meglio i meccanismi indotti dalla sovra-espressione di questi geni. Inoltre, analizzando i dati di un precedente lavoro di tesi (Giovanni Zenobi, 2018/2019), raccolti durante la fine della stagione riproduttiva di Sveva, le linee FT1 presentavano ancora fiori vitali, mentre i controlli no. Questi risultati sembrerebbero indicare che, il gene, *FT1* sia il florigene della fragola coltivata, *Fragaria x ananassa*.

7. BIBLIOGRAFIA

- Abe M., Kobayashi Y., Yamamoto S., Daimon Y., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K., Araki T., 2005. FD, a bZip protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoots apex. *Science* 1052-1056.
- Almeida, R., and Allshire, R. C. (2005). RNA silencing and genome Regulation. *Trends Cell Biol.* 15, 251–258. doi: 10.1016/j.tcb.2005.03.006.
- Alvarez, J., Guli, C.L., Yu, H.X., Smyth, D.R., 1992. Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 103-116.
- Andreotti C., Antoniaci L., Babini A.R., et al, 2010. La fragola. Collana Coltura&cultura, Ed. Script, Bologna.
- Avigdor-Avidov, H., Goldschmidt, E. E., & Kedar, N. (1977). Involvement of endogenous gibberellins in the chilling requirements of strawberry (*Fragaria× ananassa* Duch.). *Annals of Botany*, 41(5), 927-936.
- Barcélo M, El Mansouri I, Mercado JA, Quesada MA, Alfaro FP, 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. *Plant Cell Tissue Org Cult* 54:29–36.
- Battey N, Le Miere P, Tehranifar A, Cekic C, Taylor S, Shriver K Hadley P, Greenland A, Darby J Wilkinson M. 1998. Genetic and environmental control of flowering in strawberry. In: Cockshull KE, Gray D, Seymour GB, Thomas B (eds.). *Genetic and Environmental Manipulation of Horticultural Crops*. CAB International, Wallingford.
- Baulcombe, D. C. (2004). RNA silencing in plant. *Nature* 431, 356–363. doi: 10.1038/nature02874.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., et al. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 25, 1322–1326. doi: 10.1038/nbt1359.

- Barrangou, R. (2015). The roles of CRISPR–Cas systems in adaptive immunity and beyond. *Curr. Opin. Immunol.* 32, 36–41. doi: 10.1016/j.coi.2014.12.008.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano Mislata, A., Maudeno, F., 2007. Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Annual Botany* 659-676.
- Benoit Van Aken, Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution, *Trends in Biotechnology*, Volume 26, Issue 5, 2008, Pages 225-227, ISSN 0167-7799, <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.001>.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* 45, 273–297. doi: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
- Billmyre, R. B., Calo, S., Feretzaki, M., Wang, X., and Heitman, J. (2013). RNAi function, diversity, and loss in the fungal kingdom. *Chromosome Res.* 21, 561–572. doi: 10.1007/s10577-013-9388-2.
- Bortesi, L., and Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33, 41–52. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006.
- Brodersen, P., and Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22, 268–280. doi: 10.1016/j.tig.2006.03.003.
- 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.
- Campbell, T. N., and Choy, F. Y. (2005). RNA interference: past, present and future. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7, 1–6.
- Chailakhyan, M.K., 1968. Internal factors of plant flowering. *Annual Rev Plant Physiology* 1-37.

- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W., 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263-271.
- Conner, A. J., Barrell, P. J., Baldwin, S. J., Lokerse, A. S., Cooper, P. A., Erasmuson, A. K., et al. (2007). Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica* 154, 341–353. doi: 10.1007/s10681-006-9316-z.
- Coupland, G. Turck F. Fornara F., 2008. Regulation and identify of florigen: FLOWERING LOCUS T moves center stage. *Annual Review Plant Biology* 573-594.
- Daniel P. Wickland, Yoshie Hanzawa, The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms, *Molecular Plant*, Volume 8, Issue 7, 2015, Pages 983-997, ISSN 1674-2052, <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.007>.
- De Alba, A. E. M., Elvira-Matelot, E., and Vaucheret, H. (2013). Gene silencing in plants: a diversity of pathways. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1829, 1300–1308. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.10.005.
- Ding, S. W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 632–644. doi: 10.1038/nri2824.
- Escobar, M. A., Civerolo, E. L., Summerfelt, K. R., and Dandekar, A. M. (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13437–13442. doi: 10.1073/pnas.241276898.
- Fitch, M. M., Manshardt, R. M., Gonsalves, D., Slightom, J. L., & Sanford, J. C. (1992). Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Bio/technology*, 10(11), 1466-1472.
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811. doi: 10.1038/35888.

- Frizzi, A., and Huang, S. (2010). Tapping RNA silencing pathways for plant biotechnology. *Plant Biotechnol. J.* 8, 655–677. doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00505.x.
- Gelvin, S. B. (2006). *Agrobacterium virulence gene induction*. In *Agrobacterium protocols* (pp. 77-85). Humana Press.
- Giovanni Zenobi, STUDIO DEL FENOTIPO VEGETO RIPRODUTTIVO DI PIANTE DI FRAGOLA MODIFICATE CON I GENI *FT1* e *FT2* CLONATI IN FRAGOLA (2018/2019).
- Guttridge, C. G., & Thompson, P. A. (1959). Effect of gibberellic acid on length and number of epidermal cells in petioles of strawberry. *Nature*, 183(4655), 197.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science* 327, 167. doi: 10.1126/science.1179555.
- Ipsaro, J. J., and Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 20–28. doi: 10.1038/nsmb.2931.
- ISAAA, 2015. ISAAA Brief 51-2015: Infographics: Biotech crop highlights in 2015.
- Jacobsen, E., and Schouten, H. J. (2007). Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends Biotechnol.* 25, 219–223. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.03.008.
- Jaeger, K.E., Wigge P.A., 2007. FT protein acts as a long-range signal in *Arabidopsis*. *Current Biology* 1050-1054.
- James DJ, Passey AJ, Rugini E, 1988. Factors affecting high frequency plant regeneration from apple leaf tissues cultured in vitro. *J Plant Physiol* 132:148–154.
- Jianfeng Xu, Xumeng Ge, Maureen C. Dolan, Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures, *Biotechnology Advances*, Volume 29, Issue 3, 2011, Pages 278-299, ISSN 0734-9750, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.002>.

- Jansen, R., Embden, J. D., Gastra, W., and Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
- Kardailsky, I., Shukla, V.K., Ahn, H.J., Dagenais, N., Christensen, S.K., Nguyen, J.T., Chory, J., Harrison, M.J., Weigel, D., 1999. Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* 196:2196-5.
- Ketting, R. F. (2011). The many faces of RNAi. *Dev. Cell.* 20, 148–161. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.012.
- Kost, T. D., Gessler, C., Jansch, M., Flachowsky, H., Patocchi, A., and Brogini, G. A. L. (2015). Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLoS ONE* 10:e0143980. doi: 10.1371/journal.pone.0143980.
- Landi L., Mezzetti B., 2006. TDZ, auxin and genotype effects on leaf organogenesis in *Fragaria*. *Plant Cell Rep* 25: 281–288.
- Lazzerini L., Montalbani M., Pizzagalli A., Zipoli G., 2001. Ogm l’opzione biotech in agricoltura. Università degli studi di Milano.
- Limera C, Sabbadini S, Sweet JB and Mezzetti B (2017) New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species. *Front. Plant Sci.* 8:1418. doi: 10.3389/fpls.2017.01418.
- Liu, I.J., Zhang Y.C., Li Q.H., Sang Y., Mao J., Lian H.L., Wang L., Yang H.Q., 2008. COP1 mediated ubiquitination of CONSTANS is implicated in cryptochrome regulation of flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 292-306.
- Lorenzetti F., Ceccarelli S., Rosellini D., Veronesi F., 2011. *Genetica agraria. Genetica e biotecnologie per l’agricoltura.* Pàtron Editore, Bologna.

- Lusser, M., and Davies, H. V. (2013). Comparative regulatory approaches for groups of new plant breeding techniques. *Nat. Biotechnol.* 30, 437–446. doi: 10.1016/j.nbt.2013.02.004.
- Matzke, M. A., Matzke, A. J., Pruss, G. J., and Vance, V. B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 221–227. doi: 10.1016/S0959-437X(00)00183-0.
- McGarry R.C., Ayre B.G., 2012. Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Science* 71-81.
- Metzloff, M., O'dell, M., Cluster, P. D., and Flavell, R. B. (1997). RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88, 845–854.
- Mezzetti, B., Costantini, E., Chionchetti, F., Landi, L., Pandolfini, T., Spena, A. «Genetic transformation in strawberry and raspberry for improving plant productivity and fruit quality.» *Acta Horticulturae*, 2004: 107-110.
- Mezzetti B., Gentile A., (2005). Trasformazione genetica delle piante da frutto: risultati, applicazioni e sperimentazione. *Review n.2 - Italus Hortus* 12 (4), 79-92.
- Mezzetti, B., Landi, L., Pandolfini, T., & Spena, A. (2004). The *defH9-iaaM* auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC biotechnology*, 4(1), 4.
- Moore, J. N., & Hough, L. F. (1962). Relationships between auxin levels, time of floral induction and vegetative growth of the strawberry. In *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci* (Vol. 81, pp. 255-264).
- Nagamangala, K. C., Sargent, D. J., Velasco, R., Maffei, M. E., and Malnoy, M. (2015). Looking forward to genetically edited fruit crops. *Trends Biotechnol.* 33, 62–64. doi: 10.1016/j.tibtech.2014.07.003.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289. doi: 10.1105/tpc.2.4.279.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., et al. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by

repressing auxin signaling. *Science* 312, 436–439. doi: 10.1126/science.1126088.

- Osakabe, Y., and Osakabe, K. (2015). Genome editing with engineered nucleases in plants. *Plant Cell Physiol.* 5, 389–400. doi: 10.1093/pcp/pcu170.
- Parent, J. S., and Vaucheret, H. (2012). The origin and effect of small RNA signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 3:179. doi: 10.3389/fpls.2012.00179.
- Passey A.J., Barrett K.J., James D.J., 2003. Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria × ananassa* Duch.) using a range of explant types. *Plant Cell Rep* 21:397–401.
- Peil, A., Garcia-Libreros, T., Richter, K., Trognitz, F. C., Trognitz, B., Hanke, M. V., et al. (2007). Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage group 3. *Plant Breed.* 126, 470–475. doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01408.x.
- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol. Microbiol.* 6, 3343–3353. doi: 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02202.x
- Rommens, C. M. (2007). Intragenic crop improvement: combining the benefits of traditional breeding and genetic engineering. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4281–4288. doi: 10.1021/jf0706631.
- Sabbadini, S., Capriotti, L., Molesini, B. et al. Comparison of regeneration capacity and *Agrobacterium*-mediated cell transformation efficiency of different cultivars and rootstocks of *Vitis* spp. via organogenesis. *Sci Rep* 9, 582 (2019).
- Salame, T. M., Ziv, C., Hadar, Y., and Yarden, O. (2011). RNAi as a potential tool for biotechnological applications in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 501–512. doi: 10.1007/s00253-010-2928-1.
- Sansavini S., Costa G., Gucci R., Inglese P., Ramina A., Xiloyannis C., 2014. *Arboricoltura generale*. Pàtron Editore, Bologna.

- Sawa, M., Imaizumi T., Nusinov D.A., Kay S.A., 2007. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. *Science* 261-265.
- Schouten, H. J., Krens, F. A., and Jacobsen, E. (2006a). Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Rep.* 7, 750–753. doi: 10.1038/sj.embor.7400769.
- Scorza, R., Callahan, A., Dardick, C., Ravelonandro, M., Polak, J., Malinowski, T., ... & Kamenova, I. (2013). Genetic engineering of Plum pox virus resistance: ‘HoneySweet’ plum—from concept to product. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 115(1), 1-12.
- Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., et al. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *J. Insect Physiol.* 59, 1212–1221. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.08.014.
- Shulaev, V., Sargent, D., Crowhurst, R. et al. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet* 43, 109–116 (2011). <https://doi.org/10.1038/ng.740>.
- Singh, J. P., Randhawa, G. S., & Jain, N. L. (1960). Response of strawberry to gibberellic acid. *Indian Journal of Horticulture*, 17, 21-30.
- Stover, E., Driggers, R., Richardson, M. L., Hall, D. G., Duan, Y. P., and Lee, R. F. (2014). Incidence and severity of asiatic citrus canker on diverse citrus and citrus-related germplasm in a FLORIDA field planting. *HortScience* 49, 4–9.
- Suarez-Lopez, P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F., Coupland G., 2001. CONSTANS mediated between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* 1116-1120.
- Tafazoli, E., & Vince-Prue, D. (1978). A Comparison of the Effects of Long Days and Exogenous Growth Regulators on Growth and Flowering in Strawberry, *Fragaria* × *Ananassa* Duch. *Journal of Horticultural Science*, 53(4), 255-259.

- Taylor, D.R. (2002). THE PHYSIOLOGY OF FLOWERING IN STRAWBERRY. *Acta Hort.* 567, 245-251. DOI: 10.17660/ActaHortic.2002.567.50
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.567.50>.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S., and Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636–646. doi: 10.1038/nrg2842.
- Voinnet, O. (2008). Post-transcriptional RNA silencing in plant-microbe interactions: a touch of robustness and versatility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 464–470. doi: 10.1016/j.pbi.2008.04.006.
- Wagner, D., Sablowsky, R.W.M., Meverowitz, E.M., 1999. Transcriptional activation of APETALA1 by LEAFY. *Science* 582-584.
- Weigel, D., Nilsson, O., 1995. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 495-500.
- Wiggie, P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Bush W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D., 2005. Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*.» *Science* 1056-1059.
- Koskela, E.A., Sønsteby, A., Flachowsky, H., Heide O.M., Hanke, M.-V., Elomaa, P. and Hytonen, T. (2016) TERMINAL FLOWER1 is a breeding target for a novel everbearing trait and tailored flowering responses in cultivated strawberry (*Fragaria 9 ananassa* Duch.). *Plant Biotechnol. J.*, doi: 10.1111/pbi.12545
- YAMASAKI, A., & YAMASHITA, M. (1990). CHANGES IN ENDOGENOUS CYTOKININS DURING FLOWER INDUCTION OF STRAWBERRY. *Small Fruits, XXIII IHC* 345, 93-100.
- Zakaria H., Hussein G.M., Hadi A., Abdallah N., 2014. Improved regeneration and transformation protocols for three strawberry cultivars. *GM Crops & Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 5:1, 27–35.
- Zevaart, J.A.D., 2008. Leaf produced floral signals. *Current Opinion Plant Biology* 541-547.

- Zhao Yan, Liu Qingzhong, Davis Robert E., 2004. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Rep* 23:224–230.