



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

APPROCCI DI BREEDING CLASSICO E NUOVI  
STRUMENTI BIOTECNOLOGICI PER IL  
MIGLIORAMENTO GENETICO DELLA FRAGOLA  
(F. X ANANASSA DUCH)

Classic breeding and new biotechnological tools for strawberry  
genetic improvement

TIPO TESI: compilativa

Studente:  
ALESSANDRO CAMPERIO

Relatore:  
PROF. FRANCO CAPOCASA

Correlatore:  
DOTT.SSA SILVIA SABBADINI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

# SOMMARIO

SOMMARIO .....	2
ELENCO DELLE FIGURE .....	4
INTRODUZIONE .....	6
CAPITOLO 1 ORIGINE E CARATTERISTICHE BOTANICHE DELL'IBRIDO <i>FRAGARIA X ANANASSA</i> DUCH. ....	8
1.1 Origine dell'ibrido <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. ....	8
1.2 Caratteristiche botaniche dell'ibrido <i>F. x ananassa</i> Duch. ....	11
CAPITOLO 2 OBIETTIVI DEL MIGLIORAMENTO GENETICO DI <i>F. X ANANASSA</i> .....	16
2.1 Premessa .....	16
2.2 Obiettivo dell'estensione dell'epoca di raccolta (rifiorenza) .....	18
2.3 Obiettivo della qualità nutrizionale.....	21
2.4 Obiettivo di resistenza ad avversità parassitarie .....	24
2.4.1 <i>Verticilliosi</i> .....	25
2.4.2 <i>Necrosi del colletto e del rizoma</i> .....	26
2.4.3 <i>Antracnosi</i> .....	27
2.4.4 <i>Muffa grigia dei frutti</i> .....	29
CAPITOLO 3 TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO E BIOTECNOLOGIE DI SUPPORTO AL BREEDING .....	31
3.1 Premessa .....	31
3.2 Breeding classico .....	32
3.2.1 <i>Outbreeding e inbreeding</i> .....	32
3.2.2 <i>Ibridazione interspecifica</i> .....	32
3.2.3 <i>Ibridazione intraspecifica</i> .....	33
3.2.4 <i>Fasi metodologiche del breeding classico</i> .....	34
3.3 Mutagenesi.....	35
3.4 Marker Assisted Breeding.....	37
3.5 Trasformazione genetica .....	39
3.6 Cisgenesi ed intragenesi.....	41

3.7 Genome editing.....	44
3.8 RNA interference (RNAi).....	47
CAPITOLO 4 CASI DI APPLICAZIONE DEI METODI DI MIGLIORAMENTO GENETICO....	51
4.1 Premessa .....	51
4.2 Miglioramento della qualità nutrizionale.....	51
4.2.1 <i>Valutazione della qualità sensoriale e nutrizionale di genotipi di fragola coltivati in condizioni di resilienza</i> .....	51
4.2.2 <i>Variazione nel contenuto di polifenoli e vitamina C della fragola indotta dal programma di breeding</i> .....	54
4.3 Acquisizioni sulla natura del carattere della rifioritura.....	57
4.4 Miglioramento della resistenza alle avversità parassitarie.....	59
CONCLUSIONI .....	64
BIBLIOGRAFIA .....	67
RINGRAZIAMENTI .....	79

## ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: Rappresentazione schematica degli eventi di ibridazione che hanno originato F. x ananassa (Bertioli, 2019).....	9
Figura 2: Rappresentazione grafica della morfologia di una pianta di fragola (greenMe.it). .....	12
Figura 3: Modello schematizzato del ciclo vitale annuale di genotipi diversi di F. x ananassa (Sabbadini et al., 2021, IX International Strawberry Symposium).....	14
Figura 4: Modello schematico della regolazione della fioritura e della produzione di stoloni. Le frecce indicano l'attivazione e le barre indicano la repressione (Whitaker et al., 2020). .	20
Figura 5: Sintomi di verticilliosi sulla rosetta centrale (ilgiardino.wiki). ....	26
Figura 6: Sintomi di necrosi del colletto e rizoma su fragola (Department of Primary Industries and Regional Development, Government of Western Australia).....	27
Figura 7: Sintomi di antracnosi su fragola (Scheda tecnica antracnosi della fragola, Regione Emilia-Romagna).....	28
Figura 8: Infezione di B. cinerea su fragola coltivata (AgroNotizie – Image Line Network). .....	29
Figura 9: Illustrazione dei principi dell'ottenimento di piante cisgeniche e intrageniche (Limera et al., 2017).....	43
Figura 10: Illustrazione schematica della struttura del sistema CRISPR/Cas9 (Limera et al., 2017). ....	46
Figura 11: Illustrazione schematica del meccanismo di funzionamento del RNAi (Limera et al., 2017).....	49
Figura 12: Illustrazione schematica del funzionamento della strategia SIGS. L'applicazione di BioClay consente una protezione estesa mediata dal RNAi dai vari patogeni delle piante. BioClay è un complesso di RNA a doppio filamento (dsRNA) e doppio idrossido stratificato (LDH) (Fletcher et al., 2020). ....	50
Figura 13: a) Solidi Solubili (SS) e b) Acidità Titolabile (TA) per diversi tipi di incrocio. I dati sono espressi come medie triennali $\pm$ errori standard. Lettere diverse indicano differenze significative per $p < 0,05$ (test SNK) (Mazzoni et al., 2019a). ....	53

Figura 14: a) Capacità antiossidante totale (TAC), b) Contenuto fenolico totale (TPH) e c) Contenuto totale di antociani (ACY) per diversi tipi di incrocio. I dati sono .....	53
Figura 15: Contenuto in antociani delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espresso in mg di antociani 100 g <sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD, p≤0,05) (Mazzoni et al., 2021c).....	55
Figura 16: Acidi fenolici delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espressi in mg di acidi fenolici 100 g <sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD, p≤0,05) (Mazzoni et al., 2021c).....	56
Figura 17: Contenuto di vitamina C delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espresso in mg di vitamina C 100 g <sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD, p≤0,05) (Mazzoni et al., 2021c).....	56
Figura 18: A) “Sveva” WT a confronto con tre linee che sovraesprimono il gene FveFT3 sei mesi dopo il trasferimento in vivo; B) Esempio di quattro linee indipendenti sovraesprimenti il gene FveFT2 a confronto con “Sveva” WT quattro mesi dopo il trasferimento in vivo (Sabbadini et al., 2021d).....	58
Figura 19: Linea transgenica "Sveva" che sovraesprime il gene FveFT2. A) Fiore sviluppato da un germoglio coltivato su substrato di proliferazione indicato dalla freccia rossa; B) fiore fluorescente (con GFP) sviluppato da un germoglio in vitro fotografato sotto raggi UV; e C) luce bianca (bar = 2 mm) (Sabbadini et al., 2021d). .....	59
Figura 20: Efficienza di rigenerazione (%) e numero di linee transgeniche putative rilevate dopo prove di trasformazione genetica su cultivar "Sveva" e "Romina" con costrutti genici Bc-DCL1/2 e Bc-DCL1/2 + Vd-DCL1/2 RNAi (Sabbadini et al., 2021b).....	61
Figura 21: Gravità della malattia (%) e valore di controllo della malattia (%) della muffa grigia sulle piante di fragola registrati dopo l'applicazione di dsRNA e fungicidi commerciali in serra. 1 = controllo negativo (acqua); 2 = Bc-DCL1/2 dsRNA 10 ng μL <sup>-1</sup> ; 3 = Bc-DCL1/2 dsRNA 20 ng μL <sup>-1</sup> ; 4 = Bc-DCL1/2 dsRNA 50 ng μL <sup>-1</sup> ; 5 = controllo positivo (SWITCH, 0,8 g L <sup>-1</sup> ). Diverse lettere minuscole, maiuscole e minuscole in corsivo mostrano differenze significative tra i diversi trattamenti a 4, 10 e 14 dpi, rispettivamente, per p<0,05 dal test di Duncan. Ciascun valore rappresenta la media ± SE di tre esperimenti indipendenti (Sabbadini et al., 2021b).....	62

## INTRODUZIONE

La fragola è una specie frutticola diffusamente coltivata su scala globale, dal continente asiatico al continente americano, passando per quello europeo. Nella fattispecie, è possibile affermare come il prodotto di questa coltura dia il proprio contributo a molte economie rurali dell'UE, segnatamente sotto il profilo occupazionale e del valore aggiunto economico (Mezzetti et al., 2018a).

Al fine di comprendere la dimensione globale della fragolicoltura, è necessario evidenziare che la coltivazione viene praticata su 396,401 ha a livello globale per una produzione che, nel 2019, si è attestata sulle 8,885,028 t. Inoltre, risulta interessante osservare come su un arco di tempo decennale (2009-2019) le superfici investite a fragola siano aumentate da 321,551 ha a 396,401 ha, con un incremento percentuale del 36,2% di fragole raccolte (nel 2009 il raccolto è stato pari a 6,522,913 t). Stando ai dati del 2019, sono la Cina e USA a concentrare la maggior parte della produzione, pari complessivamente a circa il 50% del totale, seguiti da Messico, Turchia, Egitto e Spagna (FAOSTAT, 2019). Ponendo la lente di ingrandimento sulla fragolicoltura italiana, è possibile osservare come il totale delle superfici coltivate a fragola nel 2020 si sia attestato su 3,646 ha, con un calo del 4% rispetto al 2019; dal 2016 al 2019 si è assistito, invece, ad un aumento di 250 ha della superficie. Stando ai dati del 2020, Basilicata e Campania sono le regioni che detengono circa il 50% delle superfici complessive. La peculiarità che contraddistingue la fragolicoltura italiana è il fatto che non sia concentrata in un solo areale e che, di conseguenza, mantenga un'apprezzabile diversificazione produttiva e un assortimento varietale piuttosto ampio (Palmieri, 2020).

Il mercato europeo delle fragole è molto ampio e la richiesta dei consumatori è sensibilmente cresciuta durante l'anno. A titolo esemplificativo è utile citare un dato sul consumo interno italiano di fragole, il quale è aumentato notevolmente negli anni (+20% nel periodo 2009-2019) ed attualmente risulta stabile ma con buone prospettive (Palmieri, 2020). Per garantire il soddisfacimento della domanda, molte aziende dell'UE, ma anche di paesi terzi, stanno sostenendo sforzi notevoli per l'ampliamento degli areali di coltivazione in differenti regioni climatiche e con diversi sistemi di coltivazione, anche mediante una scelta varietale appropriata (Mezzetti et al., 2018a).

Dunque, è possibile affermare che la coltivazione della fragola è, alla luce dei dati statistici summenzionati, in costante aumento a livello globale grazie, in particolar modo, alle innovazioni varietali ottenute da numerosi programmi di miglioramento genetico (Baruzzi et al., 2017; Whitacker et al., 2017; Whitehouse et al., 2017; Zhang et al., 2017) e da applicazioni biotecnologiche e agli studi condotti al fine di acquisire nuove conoscenze sulla fisiologia delle piante per sviluppare sistemi di coltivazione avanzati. Inoltre, le risorse genetiche rimangono determinanti per i programmi di miglioramento genetico, a maggior ragione ora che possono essere integrate con conoscenze e tecnologie di genomica funzionale e molecolari innovative (Mezzetti et al., 2018a).

Attualmente esistono programmi di miglioramento genetico pubblici e privati in diversi Stati, finalizzati in gran parte alla costituzione di innovazioni varietali. Tali programmi di breeding si prefiggono il raggiungimento dei più disparati obiettivi, partendo dal presupposto che per alcuni di questi sono già stati raggiunti standard elevati (consistenza del frutto, produttività, pezzatura) (Capocasa and Mezzetti, 2018). Gli obiettivi presi in considerazione dai moderni programmi di breeding della fragola sono, ad esempio, l'adattabilità alle diverse condizioni pedo-climatiche dei vari areali di coltivazione, diversi fabbisogni in freddo, diversi habitus di fruttificazione che agevolino la raccolta del frutto, la rifioritura per estendere l'epoca di raccolta, una maggiore tolleranza nei confronti dei patogeni e delle maggiori qualità sensoriali e nutrizionali (Mezzetti et al., 2018a).

In ultima analisi, è necessario ribadire l'importanza delle recenti acquisizioni scientifiche ottenute attraverso una intensa attività di ricerca che ha condotto al sequenziamento di *Fragaria x ananassa* Duch. (Edger et al., 2019) e di *F. vesca* (Shulaev et al., 2011). Oltre al sequenziamento, nel caso di *F. x ananassa* Duch., sono stati rivelati dei dettagli cruciali per una comprensione dell'origine del genoma ottoploide. I metodi analitici impiegati da Edger et al. (2019) hanno dimostrato che determinati tratti che regolano la resistenza ai patogeni sono controllati dal subgenoma dominante di *Fragaria x ananassa*. Shulaev et al. (2011) hanno contribuito all'identificazione di geni che codificano caratteri importanti come la qualità sensoriale e nutrizionale o l'epoca di fioritura. Tali acquisizioni scientifiche potrebbero apportare un contributo cruciale agli studi evolutivisti e consentire avanzamenti nelle tecnologie molecolari applicate nell'ambito del miglioramento genetico della fragola (Edger et al., 2019).

# Capitolo 1

## ORIGINE E CARATTERISTICHE BOTANICHE DELL'IBRIDO *FRAGARIA X ANANASSA* DUCH.

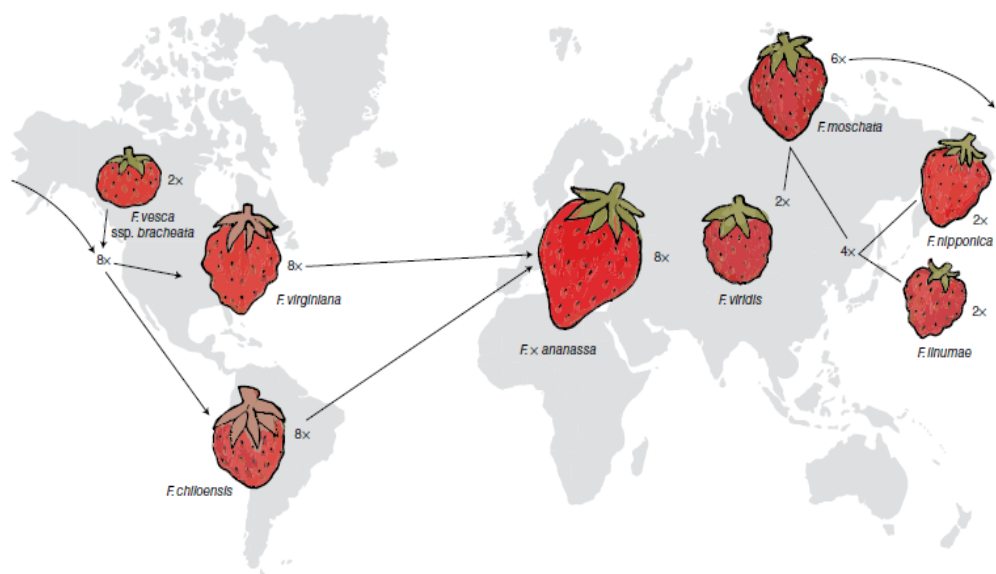
### 1.1 Origine dell'ibrido *Fragaria x ananassa* Duch.

*Fragaria x ananassa* Duch. è la specie di appartenenza della fragola coltivata, nonché della specie di fragola più diffusa sotto il profilo commerciale. Dal punto di vista sistematico è possibile inquadrare *F. x ananassa* nella famiglia delle *Rosaceae*, sottofamiglia *Rosoideae* ed infine genere *Fragaria*. Inoltre, la fragola coltivata è una specie allo-ottoploide ( $2n = 8x = 56$ ) che rappresenta il risultato di una ibridazione interspecifica avvenuta circa 300 anni fa tra due specie di fragola, entrambe ottoploidi, spontanee e provenienti dal continente americano: *Fragaria chiloensis* subsp. *chiloensis* e *Fragaria virginiana* subsp. *virginiana*. Le due ultime specie di fragola menzionate sono il prodotto di un processo evolutivo iniziato approssimativamente un milione di anni fa, a partire dalla fusione dei genomi (indicati come subgenomi) di quattro specie progenitrici appartenenti al genere *Fragaria* (Edger et al., 2019). L'identificazione di queste quattro specie di fragola ha richiesto nel corso dei decenni una intensa attività di ricerca scientifica, avviata nella prima metà del 20° secolo tramite degli studi sul “*meiotic pairing*” che a loro volta indicarono un antenato della specie diploide ( $2n = 2x = 14$ ) *Fragaria vesca* come una delle quattro specie che contribuì alla genesi del genoma ottoploide di *F. x ananassa* (Folta and Barbey, 2019). Ulteriori indicazioni sull'identità di un'altra delle quattro specie sopra menzionate giunsero da approfondite analisi genetiche, affiancate da valutazioni molecolari (Rousseau-Gueutin et al., 2009) e citologiche (Liu et al., 2016), le quali suggerirono come *F. iinumae* (specie diploide) potesse aver contribuito effettivamente al genoma di *F. x ananassa*. Al fine di fornire ulteriori chiarimenti sull'origine e l'evoluzione del genoma ottoploide della fragola coltivata sono state avanzate nel corso degli anni numerose ipotesi derivanti da studi filogenetici e delle mappe genetiche, ma lo studio che più dettagliatamente ha affrontato la tematica è stato solo di recente pubblicato ed è incentrato sul genoma di *F. x ananassa* cv “Camarosa” (Edger et al., 2019). L'attività di ricerca alla base dello studio appena citato si è focalizzata sull'analisi filogenetica dei trascrittomi di tutte le specie diploidi di fragola esistenti, incluse quattro sottospecie di *F. vesca*. Ciò ha condotto non



solo alla validazione del ruolo già attribuito a *F. vesca* e *F. iinumae*, ma anche all'identificazione delle altre due specie diploidi che mancavano all'appello: *F. nipponica* e *F. viridis* (Whitaker et al., 2020). Inoltre la particolarità dei risultati ottenuti dallo studio sopracitato è quella di aver ulteriormente circoscritto l'identità di *F. vesca* ad una sua sottospecie, cioè *F. vesca* subsp. *bracheata* (Bertioli, 2019).

Il modello presentato da Edger et al. prevede che l'origine del genoma ottoploide di *F. x ananassa* abbia avuto luogo attraverso degli eventi di ibridazione che hanno coinvolto le quattro specie diploidi progenitrici. Tali eventi sono stati i responsabili dell'introduzione di nuove specie dalla differente ploidia, a partire dall'incrocio diploide x diploide (*F. nipponica* x *F. iinumae*), al quale è seguito un incrocio tetraploide x diploide (antenato tetraploide x *F. viridis*) ed infine esaploide x diploide (antenato esaploide x *F. vesca* ssp. *bracheata*). Quest'ultimo evento di ibridazione si stima sia accaduto circa 1,1 milioni di anni fa. Dunque, il risultato previsto dal modello pocanzi citato è proprio l'origine di un antenato ottoploide (Edger et al., 2019) che è stato poi interessato da un fenomeno di evoluzione divergente scaturito nella genesi di due specie cruciali, ovvero *F. chiloensis* e *F. virginiana* (Bertioli, 2019) (Figura 1).



**Figura 1: Rappresentazione schematica degli eventi di ibridazione che hanno originato *F. x ananassa* (Bertioli, 2019).**

Le due specie di fragola appena citate, entrambe provenienti dal continente americano, sono state coinvolte in un evento di ibridazione interspecifica collocato temporalmente nel 18°

secolo in Europa; da questo incrocio ebbe origine *Fragaria x ananassa* Duch., la fragola attualmente coltivata e da cui derivano le principali varietà commercializzate.

Partendo dal presupposto che, come già affermato, la maggior parte delle varietà diffuse appartiene all'ibrido ottoploide *F. x ananassa* Duch., è necessario puntualizzare che al genere *Fragaria* appartengono numerose specie dalla differente ploidia e ad alcune di queste è già stato fatto riferimento. La classificazione delle specie più note in funzione della ploidia è la seguente: *F. vesca* L., *F. viridis* Duch., *F. nipponica*, *F. iinumae* ( $2n = 2x = 14$ ), *F. moupinensis* Cord. ( $2n = 4x = 28$ ), *F. moschata* Duch. ( $2n = 6x = 42$ ), *F. chiloensis*, *F. virginiana*, *F. x ananassa* Duch. ( $2n = 8x = 56$ ), *F. cascadiensis* Hummer ( $2n = 10x = 70$ ).

Meritevole di trattazione è la comparazione delle caratteristiche di *F. chiloensis* e *F. virginiana* poiché entrambe derivano da una specie ottoploide che, per via dell'evoluzione divergente, fu interessata dalla speciazione (Bertioli, 2019). Nella prima (sempreverde) è possibile riscontrare la presenza di foglie spesse e coriacee, lucide, di colore verde scuro e con piccioli spessi; stoloni robusti e rossastri; fiori di maggiori dimensioni, proporzionate a quelle del gineceo e dell'androceo; frutti di colore rosso opaco, maggiori dimensioni e maturazione tardiva. Nella seconda (decidua) si riscontra la presenza di foglie sottili con piccioli altrettanto esili, opache, con una colorazione oscillante tra il bluastro e il verde chiaro; stoloni esili e di colore verde; fiori di minori dimensioni; frutto con una pigmentazione tra lo scarlatto e il cremisi, di dimensioni minori e maturazione precoce (Hancock, 2020).

Il percorso che culminò con la costituzione dell'ibrido ottoploide affonda le radici agli inizi del '600, quando la fragola non era ancora adeguatamente inquadrata sotto il profilo sistematico e, soprattutto, non era valorizzata dal punto di vista agronomico. Infatti, le specie spontanee più diffuse in Europa erano tre: *F. vesca* L., *F. viridis* Duch. e *F. moschata* Duch.; queste erano impiegate più per fini ornamentali, per abbellire le bordure delle aiuole ad esempio. La condizione risolutiva che pose una netta cesura rispetto al passato fu il crescente interesse degli agricoltori europei verso una specie di fragola proveniente dal Cile, *Fragaria chiloensis* L. Il motivo alla base di questo interesse è presto detto: i suoi frutti presentavano una dimensione straordinaria, nel senso che non rientrava nell'insieme dei caratteri ordinari riscontrati nelle fragole europee. Concretamente, fu proprio il volume dei frutti ad attirare l'attenzione anche di chi non era avvezzo allo studio di questi dettagli botanici. Dunque, non è un caso se i primi esemplari di *F. chiloensis* giunsero in Europa verso il 1712 per opera di un militare francese, tale Antoine Francois Frezier, che decise di conservare delle piante raccolte in un viaggio in Cile. Nel continente europeo la coltivazione di questa specie di fragola, a differenza di quanto ci si potesse aspettare, non si diffuse particolarmente, anzi a suo

tempo venne approcciata con incertezza e diffidenza. Tuttavia, il clima di diffidenza che condizionava gli agricoltori non impedì ad un giovane francese, Antoine Nicolas Duchesne, di focalizzarsi, investendo il proprio tempo, sullo studio di questa particolare pianta. In seguito, Duchesne divenne un giardiniere del re di Francia Luigi XVI ed ebbe modo di affinare gli studi compiuti su questa specie effettuando, nel 1766, una scoperta degna di nota: oltre ad avere fiori ermafroditi, le piante di fragola potevano possedere anche fiori unisessuali. Inoltre, fu in grado di dedicare la sua attività di studio anche alla registrazione delle caratteristiche sessuali dei fiori, comprese nozioni sulla stagione di fioritura e fruttificazione, e gli effetti dei vari elementi meteorologici (Bucci et al., 2010) per poi spingersi alla realizzazione di un albero genealogico della pianta. Così facendo Duchesne identificò nell'incrocio interspecifico le fondamenta della moderna fragolicoltura. Infatti, l'ibrido di fragola attualmente coltivato, *F. x ananassa* Duch., è il risultato di un'ibridazione interspecifica tra due specie ottoploidi, come già affermato precedentemente.

Nel corso dei decenni è stato possibile, mediante programmi di miglioramento genetico mirati, apportare nuovi caratteri fenotipici alla specie, come accadde quando si prese in considerazione l'impiego di *F. virginiana* ssp. *glauca* Staudt al fine di introdurre il carattere della rifioritura neutro-diurna (indifferente al fotoperiodo) (Bucci et al., 2010).

## 1.2 Caratteristiche botaniche dell'ibrido *F. x ananassa* Duch.

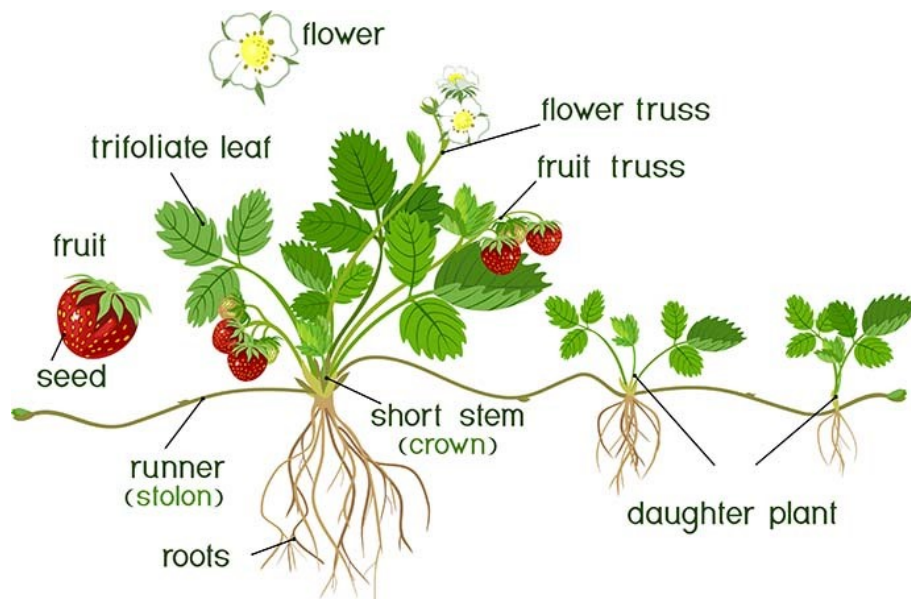
La fragola coltivata *F. x ananassa* Duch. è una pianta perenne e dal punto di vista morfologico è possibile distinguere un apparato radicale, un fusto (corona o rizoma) e un apparato fogliare.

L'apparato radicale è fascicolato, si sviluppa a partire dalla corona in prossimità della superficie del terreno e, nei casi in cui la pianta venisse coltivata in terreni dalla tessitura leggermente argillosa, potrebbe approfondirsi anche fino a 30 cm, fermo restando che tendenzialmente le radici della fragola esplorano il terreno in una fascia che va dai 25 ai 30 cm. Le radici della pianta di fragola presentano una duplice funzione: assorbimento della soluzione circolante nel terreno e accumulo di sostanze di riserva. Inoltre, la struttura dell'apparato radicale si contraddistingue per la presenza di radici primarie, derivanti dalla corona, e radici secondarie, originatesi per diramazione dalla primaria. La maggiore o minore attitudine alla radicazione varia in funzione della varietà impiegata; fattore, quest'ultimo, da cui può dipendere la capacità di formare nuovi germogli da parte del fusto della fragola.

Il fusto della pianta di fragola assume una denominazione peculiare, si tratta di una corona, cioè un fusto raccorciato (da pochi cm a 10 cm di lunghezza) che può fungere anche da sito di

immagazzinamento delle sostanze di riserva. La corona presenta al proprio interno tessuti vascolari e accresce originando nuovi germogli.

L'apparato fogliare è contraddistinto da foglie sorrette da piccioli di lunghezza variabile, composte da tre foglioline di forma ovale più o meno allungata, dentate e riunite a rosetta. La lunghezza del picciolo è molto suscettibile al termo-fotoperiodo in quanto giornate brevi e basse temperature possono drasticamente accorciarlo (Neri et al., 2006). In posizione basale rispetto alle foglie sono collocate delle gemme sensibili al termo-fotoperiodo, cioè un numero di ore di luce giornaliera e dei valori di temperatura da soddisfare al fine di compiere la differenziazione a fiore, dando così origine alle infiorescenze, oppure a stoloni o germogli. Gli stoloni sono fusti striscianti sul terreno caratterizzati ognuno da due internodi e due nodi che sottendono rispettivamente una gemma dormiente e una gemma pronta. Da questi nodi si ha, in seguito, l'emissione di nuovi germogli che sono in grado di radicare e di svilupparsi autonomamente, dando origine ad ulteriori stoloni che alimentano una rete di piantine progressivamente sempre più estesa (Figura 2).



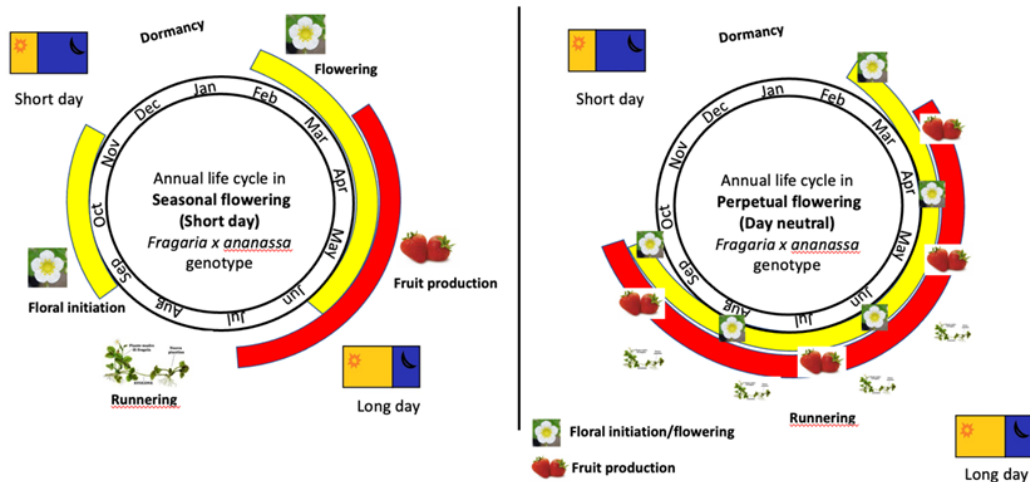
**Figura 2: Rappresentazione grafica della morfologia di una pianta di fragola (greenMe.it).**

La produzione di stoloni avviene tipicamente nella fase vegetativa, collocata temporalmente nella stagione estiva. L'insieme di piante di fragola connesse per mezzo di stoloni è denominato catena stolonifera. Questo carattere, a volte anche molto accentuato, delle piante di fragola, è sfruttato opportunamente a livello vivaistico per la propagazione agamica

della fragola coltivata. Tuttavia, tale abilità non è ad appannaggio di tutte le piante di fragola, di fatti alcune vecchie varietà rifiorenti longidiurne non sono capaci di produrre stoloni, sicché si moltiplicano per divisione dei germogli. Infine, relativamente all'apparato fogliare della pianta, è necessario evidenziare come in funzione dell'orientamento del fogliame, sia possibile individuare un habitus vegetativo assurgente o espanso (Bucci et al., 2010).

Trattato l'apparato vegetativo della pianta, è necessario focalizzarsi sulle strutture riproduttive. La trattazione delle strutture riproduttive della pianta non può però prescindere da un'ulteriore precisazione relativa ad un tema esposto precedentemente. Nella fragola, la differenziazione a fiore e, dunque, l'habitus di fruttificazione, sono sensibilmente condizionate da un sistema di controllo regolato dal termo-fotoperiodo. Sulla base di questo principio è possibile classificare diversamente le cultivar in brevidiurne, longidiurne e neutrodiurne. Le cv brevidiurne (*short day*) fioriscono una volta l'anno, perciò sono denominate unifere. Per l'induzione a fiore necessitano di una lunghezza del giorno inferiore alle 14 ore e una temperatura che oscilli tra 14-18 °C. Le cv longidiurne, anche dette *everbearing* per via del carattere rifiorente, compiono la differenziazione a fiore delle gemme quando la lunghezza delle giornate inizia ad essere superiore alle 14 ore. A differenza delle brevidiurne, sono capaci di fruttificare più volte durante l'anno. Infine si hanno le cv neutrodiurne (rifiorenti *day neutral*), le quali compiono la differenziazione a fiore delle gemme indipendentemente dal numero di ore di luce giornaliera ma, ciononostante, risultano sensibili al fattore termico. Al contrario delle longidiurne, le rifiorenti *day neutral* emettono fiori e frutti in maniera più continuativa durante l'anno (Figura 3). Le prime cv rifiorenti *day neutral* furono commercializzate nel 1979 ed erano discendenti di una accessione della specie di fragola *Fragaria virginiana* ssp. *glauca*, autoctona delle montagne dello Utah, negli USA (Longhi et al., 2014).

### Annual life cycle of Seasonal flowering and Perpetual flowering strawberry in climate temperate



**Figura 3: Modello schematizzato del ciclo vitale annuale di genotipi diversi di *F. x ananassa* (Sabbadini et al., 2021, IX International Strawberry Symposium).**

I fiori della pianta di fragola sono riuniti in numero variabile in infiorescenze denominate racemi, inseriti sul fusto o all'ascella delle foglie composte. I racemi sono dei grappoli fiorali composti, nella fattispecie, da fiori inseriti su assi di ordine crescente, classificati rispettivamente come fiori primari, secondari, terziari e così via. La durata e l'epoca della differenziazione a fiore condiziona le tempistiche di sviluppo delle infiorescenze all'interno della stessa pianta; ciò si ripercuote sulla scalarità di emissione delle infiorescenze stesse, che a sua volta si riflette sulla maturazione dei frutti e sulla scalarità di raccolta. Inoltre, è cruciale evidenziare la presenza di una correlazione nell'ambito della stessa infiorescenza, ovvero come dal fiore primario al fiore terziario, passando per il secondario e così di seguito, la dimensione finale dei frutti tenda a ridursi progressivamente.

Generalmente le piante di fragola attualmente coltivate presentano, nell'ambito dell'infiorescenza, un fiore ermafrodita ma è necessario sottolineare l'esistenza anche di piante pistillifere e staminifere. Il fiore perfetto della pianta di fragola è contraddistinto da un calice costituito da numerosi sepali; da una corolla composta da cinque o più petali di forma ellittico-ovale, comunemente di colore bianco (anche rosa); da un androceo caratterizzato da stami dati da un filamento che sorregge le antere contenenti i granuli pollinici; dal ricettacolo, sul quale i pistilli si dispongono a spirale e ciascuno di essi risulta essere composto da un ovario uniovulato che, in seguito all'evento fecondativo, darà origine a un achenio. L'achenio è comunemente considerato come il seme della fragola ma, concretamente, rappresenta il frutto secco ed indeiscente della pianta. Dunque, il frutto edule è in realtà un falso frutto, derivante

dall'ingrossamento, conseguente alla fecondazione, del ricettacolo sul quale sono collocati gli acheni. Inoltre, come precedentemente sottolineato, il frutto primario, che sotto il profilo dimensionale si distingue sempre dagli altri, può presentare una forma irregolare in alcuni casi. Le irregolarità nella forma dei frutti eduli (malformazioni) sono dovute principalmente a condizioni non favorevoli all'impollinazione, come gli sbalzi termici, la presenza insufficiente di insetti pronubi, l'eccessiva vigoria delle piante, lo scarso arieggiamento all'interno delle strutture protette. In conclusione, si evidenzia come il frutto della fragola possa presentare molteplici forme, dimensioni, colori, caratteri apprezzate diversamente uno dall'altro a livello di richiesta del mercato. Il frutto può essere molto piccolo, piccolo, medio, grosso, molto grosso; la forma può essere reniforme, sferoidale, conica, biconica, cilindrica, cuneiforme, ovoidale; il colore varia dall'aranciato chiaro al rosso scuro, passando per il rosso aranciato, il rosso ed il rosso intenso (Bucci et al., 2010).

## Capitolo 2

### OBIETTIVI DEL MIGLIORAMENTO GENETICO DI *F. X ANANASSA*

#### 2.1 Premessa

La fragola ottoploide *F. x ananassa* Duch. è interessata da circa due secoli da programmi di miglioramento genetico - sia pubblici che privati - rivolti all'ottenimento di innovazioni varietali. Nelle varietà costituite nel corso degli anni è, inoltre, possibile ravvisare una certa variabilità fenotipica dovuta all'interazione tra l'elevato livello di ploidia della fragola e il contesto ambientale in cui essa è coltivata (Faedi et al., 2010).

La costituzione dell'ibrido *F. x ananassa* Duch. è relativamente recente (seconda metà del '700) ma la comprensione delle potenzialità di questa specie da parte di agricoltori e studiosi non fu immediata; infatti, solo agli inizi del '800 vennero intraprese le prime attività di breeding sia nel continente europeo che americano. Sin dai primi programmi di breeding si individuò l'obiettivo prioritario nel perfezionamento degli standard quali-quantitativi del raccolto di fragole; il perseguimento di questa priorità determinò l'ottenimento di livelli notevoli di variabilità fenotipica espressa nelle varietà di fragole commercializzate. Di fatti, le varietà introdotte sul mercato dai programmi di breeding europei e americani vennero coltivate su scala globale per tutto il 19° e 20° sec. (Mezzetti et al., 2018a). Nella fattispecie, tra le iniziali attività di miglioramento genetico è possibile individuare quella svolta da Michael Keens in Inghilterra, la quale condusse alla costituzione della cv Keens'Seedling nel 1821, considerata come una delle progenitrici delle moderne varietà di fragola. Tuttavia, il primo vero breeder riconosciuto fu probabilmente Thomas Andrew Knight, il quale costituì tra il 1820 e il 1828 due tra le varietà più moltiplicate dai produttori di quell'epoca, cioè la cv Downton ed Elton (Scott and Lawrence, 1975). Ciò appena esposto accadeva in Europa, mentre nel continente americano uno tra i primi programmi di breeding fu avviato da C. M. Hovey che, nel suo giardino, praticò incroci tra diverse selezioni di *F. virginiana* e *F. chiloensis* con Keens'Seedling (Faedi et al., 2010). In seguito, con l'avviamento di nuovi programmi di breeding e il rilascio di nuovi genotipi, le cultivar più datate furono soppiantate da quelle di più recente costituzione, caratterizzati da una maggiore produttività e tolleranza



ad agenti patogeni e stress abiotici; tale modus operandi condusse all'assottigliamento della base genetica e, di conseguenza, alla riduzione di variabilità genetica legata all'adattabilità pedo-climatica e a determinati tratti qualitativi dei frutti (Mezzetti et al., 2018a)

Questa problematica ha rappresentato uno stimolo per molti studiosi ad intraprendere programmi di conservazione del germoplasma mediante la costituzione di collezioni varietali. Infatti le varietà attualmente coltivate, le varietà più datate con particolari caratteri e i genotipi selvatici di fragola rappresentano un patrimonio dall'inestimabile valore per la biodiversità genetica e quindi una risorsa fondamentale finalizzata alla preservazione di genotipi di fragola con tratti peculiari (Baruzzi et al., 2010). In aggiunta alla funzione precedentemente enucleata, è di importanza cruciale che le collezioni di germoplasma di fragola assicurino l'accessibilità delle risorse genetiche di alto valore ai breeders responsabili delle attività di miglioramento genetico e di applicazione delle biotecnologie.

Di fatti, i breeders che si occupano di miglioramento genetico di questa specie possono fare affidamento sull'ampiezza dell'insieme dei caratteri e tratti peculiari a disposizione, caratteristici sia dei genotipi datati che di quelli di più recente introduzione; la predilezione di un tratto piuttosto che di un altro varia di areale in areale, in funzione delle esigenze dei produttori, pratiche colturali, richieste dei consumatori, preferenze del mercato ed i requisiti dell'industria di lavorazione (Denoyes et al., 2017). Per giunta, sono numerosi i tratti peculiari del genoma di *F. x ananassa* Duch. che potrebbero essere attenzionati e l'intenzione di apportarvi miglioramenti potrebbe assurgere ad obiettivo di programmi di breeding. In generale, per numerose specie da frutto, così come per la fragola, alcuni obiettivi del passato non coincidono più con quelli moderni in quanto si ritiene siano già stati raggiunti standard elevati per alcuni di essi; nello specifico, relativamente alla situazione della fragola, si sta facendo riferimento ad obiettivi prioritari nel passato come la produttività, pezzatura e la consistenza del frutto (Capocasa and Mezzetti, 2018). Ciò non significa che, allo stato attuale, non vengano tenuti in considerazione nell'attività di breeding, ma semplicemente il focus della ricerca è stato traslato su altri caratteri al fine di assecondare le richieste del mercato e dei consumatori, i quali hanno acquisito maggiore consapevolezza, nel corso degli anni, sulla composizione nutrizionale e qualità sensoriale dei frutti. La principale implicazione di questa tendenza è rappresentata dal differente approccio del consumatore all'acquisto di frutti come la fragola, che, nella fattispecie, risulta essere contraddistinto da una maggiore esigenza nei confronti dell'aspetto qualitativo del prodotto in commercio (Mezzetti et al., 2018a). Dunque, è necessario comprendere come il miglioramento genetico della fragola debba focalizzarsi maggiormente sull'immissione in commercio di varietà che permettano di ottenere frutti

qualitativamente più apprezzabili e, contestualmente, genotipi che presentino soprattutto una maggiore tolleranza alle avversità parassitarie (in modo tale da ridurre l'impatto ambientale della coltivazione) e che consentano di ottenere un raccolto in più periodi dell'anno.

## 2.2 Obiettivo dell'estensione dell'epoca di raccolta (rifiorenza)

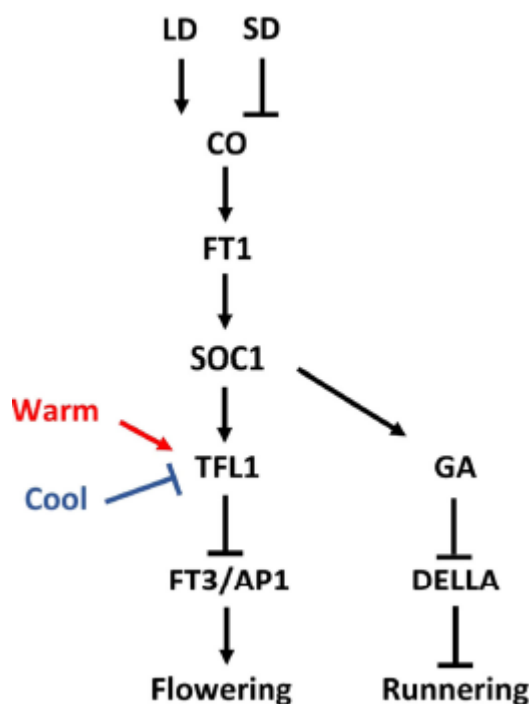
Allo stato attuale l'estensione del periodo di raccolta del prodotto risulta essere uno degli obiettivi predominanti nei programmi di miglioramento genetico della fragola; è noto, inoltre, come il raggiungimento di tale obiettivo comporti una minore dipendenza dalle importazioni di prodotto da Paesi esteri e la possibilità di ripartire adeguatamente la manodopera su un periodo di raccolta più lungo (Faedi et al., 2010). Di fatti, al fine di ampliare il calendario di raccolta, il carattere principe su cui l'attività di breeding si è focalizzata è la rifiorenza.

La moltiplicazione e la coltivazione delle cultivar rifiorenti *day neutral* non sono da considerare come prassi consolidata sin dalla costituzione dell'ibrido ottoploide oggi coltivato. Infatti, prima che fossero introdotte sul mercato internazionale, le uniche piante impiegate erano riconducibili alle cultivar rifiorenti longidiurne; tali cultivar sono in grado di rifiorire per lunghi periodi, a condizione che il numero di ore di luce giornaliera sia superiore a 12. Altrimenti, nel momento in cui la durata del giorno si riduce, i processi di induzione e differenziazione a fiore non sono più nelle condizioni di concretizzarsi. Inoltre, le cv rifiorenti longidiurne presentano una scarsa capacità stolonifera, ne discende che la moltiplicazione verrà ostacolata. La predominanza delle cultivar appena descritte si interruppe negli anni '70 del secolo scorso, quando nei programmi di breeding definiti dai breeders dell'Università della California si attuarono combinazioni di incrocio fra selezioni unifere e un clone di *F. virginiana* subsp. *glauca* capace di differenziare gemme a fiore indipendentemente dal numero di ore di luce giornaliera (Faedi et al., 2010). Le prime varietà neutrodiurne rifiorenti immesse nel mercato a ridosso degli anni '80 furono ottenute dalla terza generazione di reincrocio con cv unifere di *F. x ananassa* in cui venne impiegato un clone staminifero di *F. virginiana* subsp. *glauca* come primo parentale impollinante. In tal modo si costituirono i primi genotipi rifiorenti *day neutral*, di maggior interesse sia per la produttività che per la capacità di emettere stoloni. Attualmente il carattere della rifiorenza è riscontrabile in tutte le principali varietà coltivate su scala mondiale. Tuttavia è necessario ribadire che il carattere della rifiorenza non è esclusivamente associato alle piante di fragola con assetto cromosomico ottoploide, infatti, nell'ambito del genere *Fragaria*, è possibile riscontrarlo anche nella fragolina di bosco (*F. vesca* subsp. *semperflorens*) da cui è stata selezionata la varietà Alpine.

A conferma del notevole interesse agricolo e commerciale, è di cruciale importanza sottolineare la numerosità delle attività di ricerca che nel corso degli anni si sono focalizzate sulla definizione del controllo genetico del carattere in questione.

Dal momento che è stato affermato che esistono cultivar rifioranti neutrodiurne sia di *F. vesca* che di *F. x ananassa*, è necessario specificare che il controllo genetico del carattere della rifioritura in queste due specie risulta essere differente (Gaston et al., 2013). Sebbene esistano differenze nel controllo genetico, ciò non implica che anche il corredo genetico alla base dell'habitus di fioritura sia diverso; infatti, l'identificazione di numerosi QTL minori coinvolti nel carattere rifiorante sta ad indicare che un numero considerevole di geni sia coinvolto nella regolazione di tale tratto nella fragola ottoploide coltivata (Weebaddee et al., 2008). Le attività di ricerca finalizzate alla piena comprensione del controllo genetico non sono state avviate solo in epoca recente anzi, la loro attuazione risale alla seconda metà del 20° secolo; nella fattispecie, Brown e Wareing, (1965) determinarono che il carattere della rifioritura in *F. vesca* è controllato da un singolo gene recessivo denominato *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)* (Albani et al., 2004). Successivamente, attraverso gli studi di due gruppi di ricerca indipendenti l'uno dall'altro, è stato individuato in *F. vesca* l'omologo del *TERMINAL FLOWER1 (FvTFL1)* come gene candidato che agisce come repressore della fioritura regolato dal fotoperiodo (Iwata et al., 2012; Koskela et al., 2012). Inoltre, è stato appurato mediante caratterizzazioni funzionali che *FvTFL1* rappresenta il repressore dell'induzione fiorale nei meristemi e la sua espressione si riflette nel modello di fioritura della pianta, il quale diviene unifero. Nel momento in cui dovesse insorgere una particolare mutazione nel gene sopracitato, il modello di fioritura della pianta diventerebbe rifiorante (Castro et al., 2015). Specificamente, il carattere recessivo rifiorante è causato da una mutazione puntiforme, cioè una delezione di 2 paia di basi nella regione codificante l'omologo di *FvTFL1* (Iwata et al., 2012; Koskela et al., 2012). Un ulteriore aspetto di cui è necessario tenere conto è che, sempre nell'ambito di *F. vesca*, l'omologo del *FLOWERING LOCUS1* è effettivamente regolato da un "photoperiodic pathway"; questo peculiare meccanismo di regolazione è essenziale affinché la fioritura avvenga nel momento più opportuno ed è caratterizzato da *FLOWERING LOCUS T1 (FvFT1)* – *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 (FvSOCI)* – *TERMINAL FLOWER1 (FvTFL1)* (Mouhu et al., 2013; Honjo et al., 2015; Denoyes et al., 2017). Scendendo nei particolari, nel momento in cui il numero di ore di luce giornaliera aumenta sensibilmente, l'omologo di *COSTANS* in *F. vesca* (*FvCO*) è responsabile dell'attivazione del gene *FvFT1* nelle foglie e, di conseguenza, ciò implica una "upregulation" del gene *FvSOCI* nei meristemi apicali dei germogli (Koskela et al., 2016; Whitaker et al., 2020). Nella

situazione in cui la funzionalità del gene *FvTFL1* nella fragolina di bosco dovesse essere compromessa, il “*photoperiodic pathway*” costituito da *FvCO*, *FvFT1*, *FvSOC1* favorirebbe la fioritura, mentre nei genotipi non rifioranti la “*upregulation*” del gene *FvTFL1* da parte di *FvSOC1* invertirebbe il prodotto finale del “*pathway*”. Attualmente la comprensione dell’induzione fiorale non è completa, di fatti appare necessario approfondire lo studio del ruolo dei geni *FvFT3*, *APETALA1 (FvAPI)*, *FRUITFULL (FvFUL)*, i quali risultano essere attivati nei meristemi apicali in seguito alla “*downregulation*” del gene *FvTFL1* in corrispondenza di giorni caratterizzati da basse temperature o un numero di ore di luce giornaliere non sufficienti (Whitaker et al., 2020) (Figura 4).



**Figura 4: Modello schematico della regolazione della fioritura e della produzione di stoloni. Le frecce indicano l’attivazione e le barre indicano la repressione (Whitaker et al., 2020).**

A differenza di quanto esposto relativamente a *F. vesca*, il controllo genetico del carattere della rifioritura in *Fragaria x ananassa* Duch. si fonda su presupposti differenti; infatti, è stato dimostrato come nella fragola ottoploide coltivata l’allele della neutralità al fotoperiodismo (carattere rifiorante neutrodiurno) sia dominante sull’allele che determina il comportamento unifero (*Junebearing*), mentre in *F. vesca* risulta essere recessivo (Albani et al., 2004; Gaston et al., 2013). L’attività di ricerca condotta nell’ultimo decennio ha consentito di inquadrare

con maggiore chiarezza come il carattere rifiorante sia determinato dal corredo genetico di *F. x ananassa* Duch.; è stato appurato da Gaston et al., (2013) che il QTL denominato *FaPFRU* risulta essere correlato positivamente al carattere della rifioranza *day neutral*. Inoltre, a suffragio della loro acquisizione, hanno anche dimostrato come il controllo di tale carattere da parte del QTL *FaPFRU* nella fragola coltivata sia in linea con l'introggressione attuata per mezzo di reiterati reintroci in *F. x ananassa* Duch. di un singolo gene codificante questo particolare carattere derivante dalla specie selvatica di *F. virginiana* ssp. *glauca*. Al fine di evidenziare il differente controllo genetico nella fragola coltivata non solo della rifioranza *day neutral*, ma anche della capacità stolonifera, è cruciale sottolineare che il locus *FaPFRU* non è ortologo ai loci determinanti la rifioranza (*SFL*) e la capacità stolonifera (*R*) nella fragolina di bosco. In aggiunta a quanto appena affermato, è necessario precisare il fatto che il locus *FaPFRU* condizioni in maniera opposta l'estrinsecazione della rifioranza (effetto positivo) e della capacità stolonifera (effetto negativo) nella fragola ottoploide coltivata, indicando come i due caratteri siano geneticamente correlati e il controllo della loro fisiologia sia condiviso (Gaston et al., 2013; Denoyes et al., 2017).

### 2.3 Obiettivo della qualità nutrizionale

Le varietà di fragola commercializzate alla metà del secolo scorso erano contraddistinte soprattutto da una limitata qualità organolettica e nutrizionale; è noto come, effettivamente, la qualità del frutto (caratteristiche sensoriali e nutrizionali) sia stata giudicata come un obiettivo secondario per un arco di tempo prolungato, preferendo definire attività di breeding volte alla valorizzazione della pezzatura dei frutti in modo tale da puntare al raggiungimento di maggiori rese (Faedi et al., 2010). Nel corso degli anni le richieste e le esigenze dei consumatori sono sensibilmente variate, parallelamente alla consapevolezza dell'importanza della qualità sensoriale e nutrizionale della frutta in commercio (Sabbadini et al., 2021a). In merito alla fragola, è possibile assistere a come si stia affermando sul mercato per gli aspetti salutistici, assecondando la crescente propensione del consumatore ad apprezzare gli aspetti nutrizionali e nutraceutici della qualità del frutto (Capocasa and Mezzetti, 2018). Infatti anche gli stessi mercati hanno iniziato a ricercare e premiare sempre di più frutti dalla qualità più accentuata, unitamente agli aspetti prettamente sensoriali come la dolcezza e aroma più intensi. Logica conseguenza di questa tendenza affermata negli ultimi anni è lo svolgimento di programmi di miglioramento genetico finalizzati all'ottenimento di fragole caratterizzate da una più alta qualità nutrizionale.

Il profilo nutrizionale della fragola è determinato dal contenuto in composti nutrizionali; la qualità e la quantità delle molecole bioattive presenti all'interno del frutto condiziona la qualità nutrizionale (Mazzoni et al., 2013b). I composti nutrizionali contenuti all'interno della fragola conferiscono proprietà nutraceutiche essenziali ad essa e, grazie alla loro rilevante concentrazione nel frutto, il consumo di fragole è stato diffusamente associato alla prevenzione di patologie croniche come malattie cardiovascolari, obesità e alcune tipologie di cancro (Basu et al., 2014; Forbes-Hernandez et al., 2015; Giampieri et al., 2018). Dunque, sulla base di queste caratteristiche, segnatamente la capacità di conferire benefici dal punto di vista salutistico oltre al basilare contributo alimentare, è possibile riferirsi alla fragola come alimento funzionale (Basu et al., 2014).

Relativamente alla componente nutrizionale e fitochimica della fragola è di cruciale importanza ribadire che si valutano principalmente la capacità antiossidante totale e il contenuto totale di polifenoli e antociani. Di fatti le molecole bioattive sono rappresentate in particolar modo dalla ampia classe dei polifenoli; oltre ai polifenoli è possibile riscontrare anche la presenza di vitamine liposolubili, inclusi carotenoidi, la vitamina A, la vitamina D e la vitamina K, ma uno degli aspetti più rilevanti sotto il profilo nutrizionale è la concentrazione elevata di vitamina C (circa 60 mg/100 g di frutto fresco) e folati (20-25 µg/100 g di peso secco, una delle più alte concentrazioni registrate tra i frutti) (Giampieri et al., 2015). I polifenoli rappresentano una classe estesa ed eterogenea di composti "non-nutrizionali" biologicamente attivi. I composti maggiormente rappresentati nella classe dei polifenoli sono i flavonoidi (principalmente antocianine, in secondo luogo flavonoli e flavanoli) seguiti dai tannini idrolizzabili (ellagitannini e gallotannini) e da costituenti minori come gli acidi fenolici (acido idrossibenzoico e idrossicinnamico) e i tannini condensati (proantocianidine) (Mazzoni et al., 2013b; Mezzetti, 2013b). Allo stato attuale sono stati descritti più di 25 tipologie di antocianine derivanti da differenti varietà e selezioni; la pelargonidina-3-glucoside e la cianidina-3-glucoside sono i principali rappresentanti delle antocianine, a prescindere dai fattori genetici e ambientali in grado di influenzare la sintesi di queste molecole (Diamanti et al., 2014). Sono metaboliti secondari idrosolubili derivanti dalle piante e responsabili della pigmentazione del frutto. La presenza delle principali antocianine appare essere costante nei prodotti di tutte le varietà, tuttavia sono state rilevate delle variazioni quali-quantitative tra le differenti cultivar. Inoltre, la concentrazione delle antocianine può variare nell'ambito della stessa varietà, in funzione del grado di maturazione, fattori climatici e condizioni a cui sono sottoposte nel post-raccolta (Capocasa et al., 2008). Gli ellagitannini, affiancati dalle antocianine, sono i composti fenolici maggiormente presenti nelle fragole (Aaby et al., 2005).

Sotto il profilo della composizione chimica, sono esteri dell'acido esaoidrossidifenico e del glucosio e si manifestano in diverse strutture molecolari: monomeri, oligomeri e polimeri complessi. Unitamente ai gallotannini, i ellagitannini rappresentano i tannini idrolizzabili, i quali consentono il rilascio di acido ellagico con conseguente formazione di metaboliti, in seguito a reazione di idrolisi. Infine, i flavanoli rappresentano l'unica classe di flavonoidi che non si presenta in forma glicosilata in natura; è possibile riscontrarne la presenza in forma monomerica o polimerica all'interno della polpa o degli acheni, e si caratterizzano per proprietà antiallergiche, antiossidanti e antimicrobiche (Mazzoni et al., 2013b).

Sostanze bioattive come i composti fenolici, le antocianine, ma anche l'acido ascorbico, condizionano sensibilmente il valore di un parametro di fondamentale importanza per la definizione della qualità nutrizionale, ossia la capacità antiossidante totale (TAC). Tale parametro funge da indicatore della presenza di sostanze bioattive contraddistinte dall'attività di *scavenging* radicalico nei confronti dei ROS (Specie Reattive dell'Ossigeno), ma anche responsabili di un potenziale effetto benefico sulla salute incidendo attraverso la diminuzione dei danni di natura ossidativa nel DNA e incentivando le riparazioni (Giampieri et al., 2018). Di notevole rilievo sono i risultati di alcune pubblicazioni scientifiche (Halvorsen et al., 2006; Proteggente et al., 2002), i quali fanno emergere un quadro delle proprietà fisiologiche dei *berries* sensibilmente importante in quanto è possibile ravvisare come si collochino tra le fonti alimentari con i maggiori valori di fenoli totali e di TAC. Un ulteriore aspetto da tenere in considerazione nella determinazione della TAC delle fragole concerne i singoli composti fitochimici e il contributo che ognuno di loro apporta nella quantificazione della capacità antiossidante totale. Nella fattispecie è possibile individuare i contributori principali nell'acido ascorbico (30% della TAC) e le antocianine (25-40% della TAC), affiancati secondariamente dai derivati dell'acido ellagico e flavonoli (Tulipani et al., 2008).

Il contenuto di composti fenolici e la capacità antiossidante totale sono primariamente influenzati da fattori genetici e ambientali, ma anche dalle tecniche di coltivazione a cui le fragole sono sottoposte. Eventuali variazioni dei parametri elencati potrebbero condizionare direttamente la qualità dei frutti, da un punto di vista sia nutrizionale che sensoriale. Il background genotipico ha un ruolo di primaria importanza nella definizione della qualità nutrizionale, infatti è necessario evidenziare come tra le cultivar della stessa specie, ma soprattutto in fragole derivanti da specie diverse, sia possibile ravvisare una notevole variabilità relativamente alla TAC e ai composti con funzione antiossidante (Mezzetti, 2013b). Tale variabilità non è riscontrabile solamente tra le cultivar di una determinata specie o tra differenti specie, ma anche tra specie selvatiche e specie coltivate. A tal proposito è essenziale

puntualizzare come le fragole provenienti da piante selvatiche, ad esempio di *F. vesca*, siano contraddistinte da una maggiore capacità antiossidante totale rispetto alle fragole prodotte da *F. x ananassa* Duch., con valori più alti anche di 2.5 volte (Scalzo et al., 2005; Mezzetti, 2013b). In un contesto analogo a quello appena descritto, in cui i genotipi selvatici forniscono produzioni con tratti di maggiore interesse rispetto alle varietà commerciali, è importante sottolineare il ruolo del germoplasma selvatico locale, giudicato come una effettiva fonte di geni utili al fine di migliorare le caratteristiche nutraceutiche e nutrizionali della fragola. A titolo esemplificativo è possibile riportare la differenza in termini di composizione antocianica tra le fragole prodotte da *F. vesca* selvatica, in cui i glucosidi antocianici sono rappresentati da pelargonidina-3-glucoside e la cianidina-3-glucoside, mentre in *F. x ananassa* Duch. coltivata si riscontrano derivati di pelargonidina (Wang and Lewers, 2007; Olbricht et al., 2007; Diamanti et al., 2012). Se da un lato l'impiego del germoplasma selvatico nell'ambito di programmi di breeding risulta essere vantaggioso per determinati caratteri fenotipici (non solo composti antiossidanti ma anche tratti relativi alla qualità sensoriale), dall'altro lato è altresì cruciale ribadire la possibilità che si manifestino ripercussioni negative in termini di peso medio dei frutti e calibro; a tali problematiche è però possibile porvi rimedio, almeno parzialmente, mediante l'attuazione di reincroci con genotipi di *F. x ananassa* Duch. (Mazzoni et al., 2019a). Da questo punto di vista, è appurata l'esistenza di una correlazione negativa tra i parametri della produttività della pianta e i parametri nutrizionali e gli aspetti della qualità sensoriale (solidi solubili e acidità totale) (Capocasa et al., 2008). Tale correlazione rappresenta uno degli ostacoli principali da superare nell'attività di miglioramento genetico; tuttavia i programmi di incrocio tra genotipi di elevata qualità sensoriale (ad esempio, alto contenuto in solidi solubili) e altri caratterizzati da elevata produttività hanno permesso di selezionare nuovo materiale genetico *outlier* con i due caratteri riuniti (Faedi et al., 2010).

#### **2.4 Obiettivo di resistenza ad avversità parassitarie**

Nella maggior parte degli areali di coltivazione della fragola, ove tale coltura fosse praticata nell'ambito di sistemi intensivi, eventuali casi di peggioramento della produzione sia da un punto di vista quantitativo che qualitativo, erano ascrivibili principalmente ad avversità biotiche come funghi patogeni, insetti fitofagi e nematodi parassiti dannosi alla coltura. Una soluzione applicabile agevolmente a costi limitati, e caratterizzata da una considerevole efficienza, era il bromuro di metile, cioè un fumigante iniettato in profondità oppure distribuito sulla superficie del terreno coperto con film plastico. La fumigazione del suolo attuata con bromuro di metile permetteva di abbattere sensibilmente i potenziali di inoculo dei principali



patogeni e parassiti del terreno, ma anche di devitalizzare i semi delle infestanti più diffuse. Collateralmente all'aumento del suo impiego, le istituzioni internazionali iniziarono una fase di riflessione sulle ripercussioni ambientali del suo utilizzo diffuso. Tali considerazioni sfociarono, nel 1992, all'inclusione del bromuro di metile nell'elenco delle sostanze dannose per la fascia stratosferica di ozono nel Protocollo di Montreal. A partire dal 1992 l'utilizzo di questo fumigante venne gradualmente ridotto e tale condizione culminò con la ratifica dei Regolamenti CEE 3952/92, CEE 3093/94 e CE 2037/2000 ad opera della Commissione Europea, decretando la definitiva abolizione dell'impiego del bromuro di metile per la fumigazione dei terreni dal 1/01/2005. I fumiganti chimici ammessi in commercio come alternativa del bromuro di metile (cloropicrina ad esempio) non garantiscono però la stessa efficacia. Perciò l'unica soluzione da esplorare nel lungo termine risulta essere la resistenza o tolleranza genetica; di fatti tale quadro normativo ha stimolato le istituzioni ad incentivare le attività di ricerca affinché potessero essere individuati e costituiti genotipi contraddistinti da una maggiore tolleranza alle patologie dell'apparato radicale (Minuto e Lazzeri, 2010). Allo stato attuale la resistenza agli agenti patogeni è uno degli obiettivi più importanti dei programmi di breeding.

A livello di continente europeo, due dei principali patogeni fungini in grado di compromettere drasticamente l'integrità dell'apparato radicale e del colletto delle piante di fragola (patologie della radice e del colletto) sono *Verticillium dahliae* e *Phytophthora cactorum* (Masny et al., 2016). Mentre, relativamente alle parti superiori al colletto delle piante di fragola, due delle principali patologie fungine delle parti epigee sono l'antracnosi e la muffa grigia dei frutti.

#### 2.4.1 *Verticilliosi*

L'avvizzimento della fragola o verticilliosi è una patologia fungina causata dall'insediamento nei tessuti vegetali di *Verticillium dahliae* e *V. albo-atrum*. Le lesioni collocate in corrispondenza delle radici e determinate dalle operazioni di trapianto o da insetti fitofagi favoriscono l'infezione dell'apparato radicale, ad opera di conidi trasportati da vettori come acqua o animali. Penetrato nelle radici, il patogeno inizia a diffondersi all'interno dei vasi legnosi per mezzo del flusso di linfa grezza in senso acropeto, determinando così interferenze ormoniche e metaboliche. La sintomatologia riconducibile alla verticilliosi si manifesta tra fine estate e inizio autunno. In corrispondenza della porzione di apparato fogliare posizionata più esternamente alla corona si evidenziano imbrunimenti marginali, mentre i piccioli presentano delle striature necrotiche depresse (Figura 5).



**Figura 5: Sintomi di verticilliosi sulla rosetta centrale (ilgiardino.wiki).**

La particolarità di questo patogeno fungino è che è in grado di mantenersi vitale a lungo nel suolo, mettendo a repentaglio l'integrità anche di altre specie erbacee, arbustive e arboree. Essenziale, ai fini di una corretta prevenzione contro gli agenti eziologici della verticilliosi, è l'esecuzione di lunghe rotazioni con colture non suscettibili e l'adozione di materiale di propagazione non contaminato. Lo sviluppo del micete internamente ai fittoni ostacola la sua devitalizzazione tramite tecniche fitoiatriche al termine dell'impianto, pertanto si rende necessaria la distruzione dei residui colturali contaminati dall'infezione fungina (Lugaresi and Gengotti, 2010; Antanaviciute et al., 2015).

#### *2.4.2 Necrosi del colletto e del rizoma*

*Phytophthora cactorum* rappresenta l'agente eziologico della necrosi del colletto e del rizoma. L'infezione da parte di detto patogeno può insorgere in post-impianto o in primavera e le piante di fragole nelle quali si è insediato e riprodotto il micete, all'estirpo manuale, tendono a spezzarsi agevolmente per via della scarsa resistenza alla trazione indotta dall'alterazione dei tessuti che, infatti, presentano degli imbrunimenti rosso scuro e fenditure longitudinali situate nella corona. Successivamente, al momento della piena fioritura e dell'ingrossamento dei frutti le piante possono essere soggette ad un repentino avvizzimento, con fittoni che presentano imbrunimenti dall'estensione variabile (Figura 6).



**Figura 6: Sintomi di necrosi del colletto e rizoma su fragola (Department of Primary Industries and Regional Development, Government of Western Australia).**

Essenziale è l'impiego di piante sane e, soprattutto, che siano realizzate delle reti di sgrondo delle acque piovane al fine di evitare condizioni di saturazione idrica del terreno in quanto, tali condizioni, sono favorevoli alla germinazione delle oospore e alla conseguente emissione di zoospore per mezzo degli sporangi. Infine, le zoospore così prodotte potrebbero avviare un nuovo ciclo infettivo penetrando nella pianta attraverso l'apparato radicale (Hardham, 2001; Eikemo and Stensvand, 2015). Da più di dieci anni si sta assistendo a un'ampia diffusione di *P. cactorum* nel continente europeo e le principali ragioni alla base dell'accresciuta incidenza del patogeno sono riconducibili a all'impiego eccessivo di varietà suscettibili nella maggior parte degli areali di coltivazione, l'introduzione accidentale dell'agente patogeno all'interno dei vivai a causa della presenza di piante di fragola asintomatiche e, per concludere, gli effetti contenuti dei fumiganti alternativi al bromuro di metile (Perez-Jimenez et al., 2012).

#### 2.4.3 Antracnosi

L'antracnosi rappresenta una delle fitopatie più gravi tra quelle tipicamente diffuse negli areali fragolicoli italiani ed europei. L'antracnosi della fragola è causata da molteplici agenti eziologici di natura fungina, appartenenti, però, allo stesso genere, cioè *Colletotrichum*.

*Colletotrichum fragariae* e *C. gloeosporioides* sono responsabili principalmente dell'insorgenza di sintomi come il marciume della corona e di lesioni sui tessuti vegetali, mentre *C. acutatum* è associato alla comparsa di sintomi come il marciume dei frutti (Peres et

al., 2005). Il quadro sintomatologico legato all'antracnosi è piuttosto variegato, in quanto, come già accennato, parte dei sintomi si manifesta in fase vegetativa su tessuti fogliari, steli, stoloni, piccioli fogliari, peduncoli fiorali, corona e colletto. In particolare, su stoloni, piccioli e peduncoli possono avere luogo delle lesioni scure e depresse che, confluendo, causano strozzature e blocchi di crescita. Ulteriori sintomi possono manifestarsi sui frutti, sui quali si evidenziano inizialmente tacche oleose che, in un secondo momento, appaiono depresse e di colore marrone; il decorso di tali sintomi prevede l'insorgenza di un'efflorescenza mucillaginosa di colore simile a quello delle tacche precedentemente formatisi, caratterizzata dalle fruttificazioni acervulari del patogeno (Figura 7).



***Figura 7: Sintomi di antracnosi su fragola (Scheda tecnica antracnosi della fragola, Regione Emilia-Romagna).***

. I residui colturali infetti dell'annata precedente o le piantine provenienti da ambienti contaminati rappresentano le fonti d'inoculo, di fatti una delle principali operazioni da effettuare per garantire la prevenzione della patologia fungina è l'asportazione e distruzione di fiori e frutti colpiti in campo, oltre all'adozione di ampie rotazioni e l'irrigazione sotto pacciamatura. Inoltre, risulta essere essenziale, al fine di prevenire l'infezione fungina, l'utilizzo di materiale di propagazione sano e, dunque, l'applicazione in ambito vivaistico di certesine tecniche agronomiche e fitoiatriche, atte a contenere la diffusione del patogeno, moltiplicando materiale sano in ambienti isolati (Lugaresi e Gengotti, 2010).

#### 2.4.4 Muffa grigia dei frutti

La muffa grigia della fragola è determinata da *Botrytis cinerea*, ascomicete contraddistinto non da una specificità nei confronti di un determinato ospite, bensì dalla capacità di infettare più di 200 specie vegetali, tra cui la fragola (Elad et al., 2016). Tale patogeno è considerato il più comune e importante patogeno di fragola sia in fase di pre-raccolta che in post-raccolta (Haile et al., 2019). L'infezione da *B. cinerea* può infatti avvenire sia prima della raccolta in campo, sia rimanere latente durante la fase conservativa dei frutti, anche in condizioni di basse temperature (Feliziani e Romanazzi, 2016). La patologia fungina in questione si manifesta su fragola mediante la comparsa di una serie di sintomi riguardanti i peduncoli fogliari, steli, fiori, calici, foglie e frutti. Specificamente, sui frutti l'infezione si palesa sotto forma di macchie bruno chiare traslucide sulle quali è possibile notare la presenza di feltri grigiastri contenenti gli organi di diffusione della malattia (Figura 8).



**Figura 8: Infezione di *B. cinerea* su fragola coltivata (AgroNotizie – Image Line Network).**

Gli stessi fiori della pianta, se interessati dall'infezione fungina, si inscuriscono, presentando successivamente la caratteristica muffa grigiastra fino al completo raggrinzimento. Inoltre, nel momento in cui l'infezione raggiungesse anche gli organi del gineceo e dell'androceo, conseguirebbe un drastico calo della fertilità e la formazione di bacche sensibilmente deformate (Lugaresi and Gengotti, 2010). Le infezioni di *B. cinerea* presentano una maggiore gravità in impianti fragolicoli contraddistinti da una notevole densità

di piante e dalla presenza di bacche a stretto contatto l'una con l'altra o a contatto col suolo nudo (ad oggi, è possibile evitare tale eventualità attraverso la pacciamatura delle file su cui sono posizionate le piantine) (Hancock, 2020). Le condizioni microclimatiche che si generano nelle situazioni summenzionate determinano una maggiore gravità dell'infezione a causa del ristagno di umidità, ragion per cui è auspicabile evitare di adottare impianti irrigui per aspersione, i quali contribuirebbero ad esasperare il grado di gravità delle infezioni fungine in corso.

Infine, è noto come la suscettibilità della fragola alle infezioni di *B. cinerea* sia condizionata dal grado di maturazione dei frutti. Infatti, con il progredire del processo di maturazione dei frutti, la suscettibilità della pianta tende ad aumentare, sebbene il patogeno in questione sia in grado di promuovere la suscettibilità anche nei frutti relativamente immaturi attraverso l'attivazione di processi correlati alla maturazione stessa (Blanco-Ulate et al., 2016; Petrasch et al., 2019).



## Capitolo 3

### TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO E BIOTECNOLOGIE DI SUPPORTO AL BREEDING

#### 3.1 Premessa

La fragola coltivata è stata ed è tuttora oggetto di vari programmi di miglioramento genetico condotti su scala globale, dagli USA alla Cina passando per la Francia, l'Italia, l'Inghilterra e la Spagna. La suddetta attività di breeding ha generato un notevole impulso alla innovazione varietale, a tal punto da far sì che tali nuove varietà ottenessero un impatto degno di nota sia sui mercati locali che internazionali (Mezzetti et al., 2018a).

Nel corso degli ultimi decenni, l'attività sperimentale di ricerca in campo fragolicolo si è focalizzata su numerosi obiettivi da perseguire, immettendo nel mercato varietà sempre più rispondenti alle esigenze dei consumatori. Il perseguimento di questi numerosi obiettivi è avvenuto e sta proseguendo attraverso l'applicazione di varie tecniche di breeding, dalle più tradizionali a quelle moderne e di recente introduzione. In effetti, nel momento in cui un obiettivo di miglioramento genetico non risulta essere agevolmente conseguibile tramite metodi classici di breeding, la possibilità di rivolgersi all'ingegneria genetica ed alle biotecnologie di supporto al miglioramento genetico potrebbe rappresentare una soluzione potenzialmente valida (Lorenzetti et al., 2018). Infatti, nel corso degli anni si è assistito ad un rapido sviluppo di nuovi approcci biotecnologici ed è cruciale sottolineare che, peraltro, il processo di sviluppo e sperimentazione di ulteriori valide soluzioni da mettere a disposizione delle attività di ricerca dei breeders non si è ancora arrestato. Tale tendenza pone le basi per la futura costituzione di nuove varietà di piante da frutto in una maniera maggiormente efficiente ed incline ad intercettare le richieste del mercato di maggiore sostenibilità nel campo agricolo (Limera et al., 2017; Sabbadini et al., 2021a).

Di seguito saranno passati in rassegna e trattati nei vari aspetti che li caratterizzano i differenti metodi di miglioramento genetico, partendo dal breeding classico fino agli approcci biotecnologici di più recente introduzione, in grado di apportare modifiche al genoma delle piante in maniera estremamente puntuale e precisa.

### 3.2 Breeding classico

La fragola coltivata, *F. x ananassa* Duch., rappresenta una delle colture maggiormente interessate da una sistematica attività di breeding, segnatamente a partire dalla sua costituzione mediante ibridazione interspecifica e dalla successiva azione del miglioratore Andrew T. Knight, artefice della costituzione delle prime varietà all'inizio dell'800. Nel corso di questi due secoli, l'azione di miglioramento genetico ad opera dei breeders è proseguita ed evoluta sino agli anni correnti (Hancock, 2020); risulta sufficiente constatare, al fine di ribadire l'importanza di questi lavori, che le varietà diffuse sul mercato sono al 98% clonali e propagate per stoloni, ma soprattutto prodotte da incrocio interspecifico e intraspecifico (Mezzetti and Capocasa, 2018).

#### 3.2.1 Outbreeding e inbreeding

Il metodo outbreeding, o esincrocio, è stato impiegato sovente in passato per il miglioramento di determinati caratteri della fragola coltivata (Darrow, 1966). Nel sistema di breeding in questione la totalità dei caratteri segrega in ogni generazione di semenzali e, in aggiunta, la pressione selettiva viene esercitata contestualmente su ciascuno di questi caratteri. L'obiettivo ultimo da perseguire nell'ambito di tali azioni di miglioramento è la selezione dei semenzali contraddistinti dalla combinazione più favorevole dei vari caratteri di interesse agronomico, tenendo in conto la necessità che la nuova combinazione di caratteri sia superiore a quelle presente nei parentali.

La costituzione di nuove cultivar è stata resa possibile in passato anche dall'applicazione dell'inbreeding, metodo che non è stato impiegato così estesamente come quello precedentemente citato. Le ragioni del minor utilizzo dell'inbreeding risiedono nella comparsa di generazioni sempre meno vigorose e caratterizzate da manifestazioni fenotipiche dei caratteri condizionate negativamente da tale fenomeno, cioè la depressione da inbreeding (Morrow and Darrow, 1952). Sebbene il metodo in questione presenti le suddette implicazioni negative, è necessario puntualizzare il fatto che rappresenti comunque un approccio utile alla fissazione di geni codificanti per particolari caratteri nelle linee pure (Morrow and Darrow, 1952).

#### 3.2.2 Ibridazione interspecifica

Il ricorso all'ibridazione interspecifica si concretizza qualora si manifesti la volontà di incrementare il livello di variabilità genetica di una specie coltivata, come ad esempio *F. x ananassa* Duch.; la variabilità genetica caratteristica della specie aumenta poiché l'incrocio



vede coinvolti parentali selezionati per determinati caratteri che si desidera siano estrinsecati dalle piante risultanti. La genesi della fragola coltivata in epoca odierna si fonda esattamente su questa tipologia di evento riproduttivo tra due specie di fragola ottoploidi; per giunta, tutte le specie ottoploidi di fragola sono interfertili e hanno contribuito al miglioramento dei caratteri della specie attualmente coltivata. L'incorporazione di particolari geni - che governano l'espressione di determinati caratteri (resistenza a stress biotici o qualità del frutto) - provenienti da specie (anche selvatiche di scarso valore agronomico) differenti da quella coltivata, potrebbe essere ostacolata dalla presenza di altri geni che controllano l'espressione di caratteri indesiderati (minore calibro dei frutti, suscettibilità ad alcune patologie, scarsa pigmentazione dei frutti, sterilità). Dunque, conseguentemente all'impiego di altre specie di fragola - diverse da quella coltivata - nei programmi di breeding, risultano necessari almeno 3-4 generazioni di semenzali a partire dal backcross fino alla specie coltivata al fine di ottenere materiale da immettere sul mercato (Scott and Lawrence, 1975.). La tecnica del backcross o reincrocio consiste nel trasferimento di uno o più geni dal genitore donatore al genitore ricorrente, vale a dire la specie agronomicamente interessante a cui mancano tali geni. Un requisito essenziale di questa tecnica è la disponibilità di linee pure e, in sintesi, il risultato finale è la costituzione di una nuova linea pura identica al genitore ricorrente, con l'aggiunta del carattere che si desiderava trasferire. Generalmente, il trasferimento di determinati caratteri mediante reincrocio può essere ostacolato da alcuni fattori come il controllo poligenico di uno dei caratteri o l'associazione stretta del carattere da introgredire con altri caratteri negativi. Le piante F1 prodotte dal primo incrocio vengono incrociate di nuovo con il genitore ricorrente, generando la prima generazione di reincrocio (BC1). Tale operazione di reincrocio viene reiterata più volte, in successione, selezionando ad ogni generazione gli individui che presentano il carattere fornito dal donatore (Testolin et al., 2012). Risulta essere chiaro che l'avanzamento verso l'omozigosi ottenuto tramite reincrocio presenta la stessa rapidità di quello generato dall'autofecondazione; d'altro canto è cruciale però puntualizzare che nel reincrocio i loci raggiungono l'omozigosi per gli alleli del genitore ricorrente mentre nell'autofecondazione l'omozigosi viene raggiunta per combinazioni diverse di alleli provenienti da entrambi i genitori. Nonostante il prodotto finale di un programma di reincrocio presenti un genotipo con caratteristiche del genitore ricorrente arricchito dalle caratteristiche desiderate (fornite dal donatore), risulta tuttavia necessario eseguire prove agronomiche che verifichino i risultati conseguiti (Lorenzetti et al., 2018).

### 3.2.3 Ibridazione intraspecifica

L'ibridazione intraspecifica rappresenta un metodo di breeding che prevede l'attuazione di un incrocio controllato tra piante appartenenti alla stessa specie, mirando a riunire nella progenie i geni di due o più genotipi diversi (parentali) al fine di centrare obiettivi come la genesi di nuova variabilità genetica con la ricombinazione e segregazione dei geni dei parentali o la possibilità di eseguire prove di progenie. La definizione degli obiettivi del programma di incrocio, l'individuazione dell'ideotipo in base al quale selezionare i genitori da ibridare e la scelta del metodo da assecondare per la selezione nelle generazioni segreganti, sono fasi essenziali che il miglioratore deve rispettare al fine di svolgere l'incrocio nel migliore dei modi.

Nel programma di incrocio si utilizza in genere uno schema di ricombinazione complementare, per sfruttare la varianza non additiva e la capacità combinatoria specifica, utilizzando soprattutto genotipi di cui si conosce la genealogia. In seguito, si passa ad uno schema di selezione ricorrente impiegando come parentali, in ogni generazione d'incrocio, le selezioni migliori della generazione precedente e/o che risultano di particolare interesse per la loro attitudine a trasmettere caratteri interessanti (breeding line).

Gli alleli favorevoli per i caratteri da migliorare possono localizzarsi anche al di fuori della coppia di parentali selezionati. In tal caso sarà necessario introdurre nello schema di incrocio un ulteriore parentale da incrociare con la F1. Risulta opportuno evidenziare, però, che tanto maggiore è il numero di genitori impiegati, tanto maggiore sarà l'incremento di variabilità genetica e la difficoltà nel manipolare le generazioni segreganti. Pertanto, una volta terminata l'ibridazione, il breeder dovrà individuare e far proprio il metodo che ritiene più idoneo alla manipolazione delle generazioni segreganti (Lorenzetti et al., 2018).

#### 3.2.4 Fasi metodologiche del breeding classico

Lo svolgimento della pratica dell'incrocio manuale si fonda su una serie di azioni atte a permettere la fecondazione delle ovocellule degli ovari di una pianta da parte dei granuli pollinici provenienti da una pianta differente di un'altra specie o della stessa specie.

La prima azione da compiere, per garantire la possibilità che abbia luogo l'incrocio, è l'emasculazione dei fiori delle piante, cioè l'asportazione di sepali e stami mediante l'utilizzo di una pinzetta sterilizzata, evitando la rottura dei tessuti delle antere e il conseguente rilascio di granuli pollinici. Per giunta, tale operazione andrebbe svolta giorni prima dell'antesi, sempre per evitare l'autofecondazione. Successivamente, si rende necessaria la protezione dei fiori con l'applicazione di sacchetti, in modo tale da prevenire fenomeni di inquinamento pollinico. Le antere prelevate dai fiori di altri parentali sono collocate in piastre Petri da porre in condizioni di 20-25 °C per 24 ore per la produzione di polline. Dopodiché l'impollinazione

va eseguita quando la recettività della superficie stigmatica è massima ed utilizzando un pennello imbrattato di polline del parentale con cui si lambiscono delicatamente i fiori emasculati. Una volta effettuato l'incrocio, è necessario attendere dai 25 ai 30 giorni per la raccolta dei frutti maturi, per poi proseguire con la separazione degli acheni (ripuliti dalla polpa) frutto dell'impollinazione controllata. I giovani semenzali ottenuti dalla germinazione dei semi devono essere manipolati delicatamente nel periodo immediatamente successivo all'emergenza delle plantule. Il conseguente allevamento dei semenzali in appositi contenitori posti in ambiente protetto avviene dopo alcune settimane di crescita delle piantine; tale fase precede il trasferimento in campo dei semenzali, utile all'esecuzione delle prove agronomiche attraverso le quali valutare i differenti caratteri (tolleranza ai patogeni, ampliamento del periodo di raccolta, componenti della qualità nutrizionale ad esempio) per i quali si avviano programmi di miglioramento genetico (Faedi et al., 2010; Scott and Lawrence, 1975).

### 3.3 Mutagenesi

Le mutazioni sono eventi rari, casuali ed improvvisi in natura; tali eventi generano cambiamenti del materiale genetico, sono la base della variabilità genetica, della selezione e del miglioramento genetico. Specificamente, le mutazioni possono interessare l'organizzazione del materiale genetico di una pianta a livello genomico, cromosomico e genico. Inoltre, questi sono classificabili in spontanee, che insorgono in condizioni normali senza specifici agenti esterni identificabili, e indotte, cioè dovute ad agenti esterni di natura fisica o chimica. Appare ragionevole supporre che nelle specie coltivate siano comparse molte delle mutazioni possibili e che la selezione naturale e quella attuata dall'uomo abbiano conservato tutti gli alleli superiori (Lorenzetti et al., 2018).

I primi tentativi di impiego dei vari approcci caratteristici della mutagenesi per il miglioramento genetico delle piante risalgono agli anni '50 del secolo scorso. L'obiettivo essenziale di questa tecnica è il miglioramento di varietà esistenti apportando cambiamenti ad uno o pochi caratteri che non consentono alla pianta di esprimersi appieno sotto il profilo della produzione quali-quantitativa (Lorenzetti et al., 2018). In aggiunta, la mutagenesi è stata già applicata nelle piante da frutto per modificare tratti genici in grado di condizionare l'epoca di fioritura, la maturazione dei frutti, la resistenza ai patogeni e l'auto-compatibilità (Murti et al., 2013). L'impatto economico delle varietà ottenute dall'applicazione di questa tecnica risulta essere rilevante, segnatamente nelle specie di riso, orzo, frumento, cotone.

Restringendo il campo, il riferimento alla mutagenesi implica la trattazione delle mutazioni indotte; quest'ultime sono indotte da agenti esterni denominati mutageni, di tipo fisico o

chimico, in grado di determinare mutazioni in intere piante, colture cellulari in vitro e semenzali, anche se i semi rappresentano il materiale più frequentemente adottato per il compimento della mutagenesi.

I mutageni fisici utilizzati più diffusamente sono le radiazioni ionizzanti e non ionizzanti. Tra le radiazioni non ionizzanti è possibile riconoscere la luce ultravioletta, che causa mutazioni solo alle lunghezze d'onda più corte. Relativamente alle radiazioni ionizzanti si riscontrano i raggi X, neutroni veloci, particelle  $\alpha$  e  $\beta$  e raggi  $\gamma$ . I raggi X sono onde elettromagnetiche la cui lunghezza d'onda si attesta tra i 10 Å e 0,001 Å; presentano una agevole applicazione a semi o parti di pianta, un dosaggio facile e specifico per ciascun materiale e nessun problema di scarico di residui radioattivi. I neutroni veloci, per provocare rotture nelle molecole di DNA, dovrebbero avere una energia compresa tra 500 keV e 5 MeV; sono coadiuvati da radiazione gamma nella loro azione e, a differenza dei raggi X, sono in grado di penetrare nei tessuti vegetali per molti centimetri, provocando tendenzialmente delezioni di entità variabile, da 1 bp a decine di kbp. Le particelle  $\alpha$  sono rilasciate per decadimento dai radioisotopi del radon e dell'uranio, invece le particelle  $\beta$  sono emesse dai radioisotopi del fosforo e dello zolfo. I radioisotopi degli elementi essenziali del metabolismo, come il fosforo o lo zolfo, sono preferiti in quanto la loro energia viene dispersa abbastanza rapidamente. D'altro canto, però, essendo necessarie precauzioni in termini di personale specializzato ed equipaggiamento, i miglioratori prediligono sovente l'impiego di altri mutageni. Infine, i raggi  $\gamma$  sono radiazioni emesse prevalentemente da cobalto radioattivo e, a differenza dei raggi X, presentano una lunghezza d'onda più corta, che li rende più penetranti. In sintesi, le radiazioni ionizzanti sono in grado di condizionare le cellule vegetali impedendone la divisione, la sintesi degli acidi nucleici, provocando mutazioni geniche o la rottura dei cromosomi e dei cromatidi con successivi riarrangiamenti strutturali e anomalie (Lorenzetti et al., 2018; Lorenzetti et al., 2011).

I mutageni chimici si classificano in tre classi, cioè la classe delle sostanze chimiche che reagiscono con il DNA, variando le basi azotate affinché esse non si appaiano più normalmente; sostanze analoghe alle basi nucleotidiche che possono essere inglobate nel DNA determinando errori di replicazione (5-bromuracile); agenti intercalanti che si inseriscono tra le coppie di basi e inducono anch'essi errori di replicazione (bromuro di etidio). A titolo esemplificativo, è possibile fare riferimento all'etilmetansulfonato (EMS), ossia un mutageno chimico del gruppo delle sostanze alchilanti (compresi nella prima classe) e tra i più impiegati nelle specie vegetali, inclusa *F. x ananassa* Duch. La mutazione indotta più frequentemente dall'utilizzo di tale agente mutageno è dovuta al trasferimento del gruppo etilico della

molecola all'azoto in posizione 7 dell'anello purinico della guanina; in tal modo si origina una base azotata anomala, in corrispondenza della quale viene solitamente incorporata timina piuttosto che citosina, favorendo così l'insorgenza della mutazione C/G→T/A (Lorenzetti et al., 2018).

Un caso di implementazione della mutagenesi indotta su fragola è rappresentato dallo studio compiuto da Murti et al., (2013); lo studio in questione è stato condotto con la finalità di valutare l'effetto su germogli di fragola in vitro di trattamenti a base di raggi gamma o raggi gamma in abbinamento all'applicazione di EMS. In seguito, è stato possibile selezionare apprezzabili varianti in termini di peso dei frutti, colore e contenuto in solidi solubili, le quali sono state successivamente validate come mutanti. Infine, è stato appurato come il trattamento caratterizzato dalla combinazione di raggi gamma e esposizione ad EMS sia stato maggiormente efficace nel generare più tipi di varianti.

### 3.4 Marker Assisted Breeding

L'introduzione di strumenti come marcatori molecolari e mappe genetiche ha consentito ai breeders di approcciarsi al miglioramento genetico tramite una nuova soluzione da esplorare, cioè il breeding assistito dai marcatori (MAB, Marker Assisted Breeding). In sostanza, il miglioratore anziché eseguire la selezione sul carattere oggetto di interesse, opera la selezione su un marcatore strettamente associato a quel carattere. Il fatto che il marcatore e il carattere siano strettamente associati sta a significare che non danno ricombinazione o la danno con frequenza trascurabile, in quanto le loro sequenze nucleotidiche sono localizzate sullo stesso cromosoma e in prossimità l'una dell'altra. Tale pratica permette di risparmiare tempo, lavoro e risorse grazie allo svolgimento di analisi di caratterizzazione molecolare in laboratorio, oltre che effettuare la selezione di singole piante entro ampie popolazioni eliminando l'effetto dei fattori ambientali. Peraltro, i marcatori individuati negli studi di mappaggio, generalmente, non sono direttamente utilizzabili nella selezione assistita dai marcatori, poiché la loro attendibilità nel predire il fenotipo potrebbe essere insufficiente; dunque, risulta di fondamentale importanza il ricorso al mappaggio ad alta risoluzione, la validazione dei marcatori e la loro conversione in marcatori dal più agevole impiego. Relativamente al mappaggio, è di sostanziale importanza precisare che maggiore è la distanza che separa un marcatore da un QTL (*Quantitative Trait Loci*), più alta è la probabilità che un evento di ricombinazione interrompa la loro associazione, diminuendo l'attendibilità e l'utilità del marcatore stesso (Testolin et al., 2012; Russell et al., 2016).

I marcatori evidenziati attraverso analisi QTL devono essere necessariamente sottoposti a validazione affinché possa essere verificata la loro efficacia nel determinare il fenotipo bersaglio. L'impiego dei marcatori molecolari nell'ambito del miglioramento genetico della fragola coltivata è evoluto sensibilmente nel corso degli ultimi venti anni. In passato, si prediligeva l'utilizzo di marcatori come AFLP, RFLP, RAPD e ISSR; tuttavia, a discapito del loro utilizzo, sono emerse delle criticità in termini di costi, grado dei polimorfismi, trasferibilità e riproducibilità. Alla luce di tali aspetti critici, si è preferito virare sull'adozione di altri marcatori molecolari – come SNP e SSR – che, attualmente, risultano essere ampiamente impiegati per la selezione assistita da marcatori finalizzata a contribuire a programmi di breeding di *F. x ananassa* Duch. (Zorrilla-Fontanesi et al., 2012). Relativamente all'impiego dei marcatori molecolari multi-locus SSR, è necessario specificare che il loro uso per la selezione assistita da marcatori ad elevata processività potrebbe risultare complicato, così come potrebbe essere ostacolato da limitazioni il loro impiego nel mappaggio fine (Verma et al., 2018).

Inoltre, qualora il breeding assistito da marcatori fosse adottato in corrispondenza della fase della selezione dal *pool* parentale oppure per la selezione di specifiche combinazioni di incrocio, si farebbe riferimento alla *Marker Assisted Parent Selection* (MAPS). Invece, se applicata al fine di selezionare semenzali all'interno o tra famiglie, si tratterebbe della *Marker Assisted Seedling Selection* (MASS) (Verma et al., 2018; Mezzetti and Sabbadini, 2019).

Un'ulteriore applicazione della selezione assistita dai marcatori è rappresentata dal reincrocio assistito da marcatori (MABC, *Marker Assisted Backcross*). Tale tecnica di reincrocio è stata messa in pratica sempre più frequentemente a partire dagli anni '90 del secolo scorso per attuare il miglioramento di varietà già introdotte in commercio ma deficitarie per una specifica caratteristica per la quale siano disponibili alleli migliorativi. La soluzione offerta dalla MABC consente, rispetto alla procedura classica di reincrocio, di selezionare in modo più efficace le piante che portano l'allele del donatore al locus oggetto di interesse, di recuperare il genoma del genitore ricorrente con maggiore rapidità e, soprattutto, di identificare le piante detentrici del segmento più breve possibile del cromosoma del genitore donatore. Lo svolgimento del reincrocio assistito da marcatori si articola in tre livelli distinti. Il primo livello, indicato come *foreground selection*, prevede la possibilità di impiegare i marcatori associati al gene/QTL in combinazione alla caratterizzazione fenotipica per locus target; l'utilità dell'approccio del primo livello si rivela anche nella selezione di caratteri difficili da valutare poiché caratterizzati da bassa ereditabilità. Il secondo livello, denominato *recombinant selection*, viene utilizzato in modo tale da diminuire la dimensione del segmento

cromosomico del parentale donatore contenente il gene target. La riduzione di questo segmento cromosomico abbassa la possibilità di trasferire geni indesiderati ad esso associati, evitando così il fenomeno del *linkage drag*. Infine, il terzo livello (*background selection*) rende più celere il recupero del genoma del parentale ricorrente, favorendo la selezione degli individui che presentano la più alta percentuale del patrimonio genetico del genitore ricorrente (Russell et al., 2016; Nadeem et al., 2017).

### 3.5 Trasformazione genetica

La trasformazione genetica è una tecnica che consente il trasferimento, l'inserimento e l'integrazione di uno o più geni da un organismo all'altro e conduce all'ottenimento di piante transgeniche o cisgeniche/intrageniche, se la sequenza introgressa nell'ospite appartiene alla specie stessa o ad una sessualmente compatibile (Limeria et al., 2017). La sperimentazione e la commercializzazione di tali organismi sono subordinate al rispetto della direttiva europea 2001/18/CE, la quale definisce OGM "un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale". Il trasferimento di geni nelle piante viene principalmente eseguito impiegando una tecnica di trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*, mentre la tecnica di trasferimento diretto quale il bombardamento con microproiettili (biolostica) viene utilizzata meno frequentemente. Il primo tentativo di trasformazione genetica su fragola risale al 1990, quando Nehra et al., (1990) inocularono un ceppo di *A. tumefaciens* all'interno di dischi di foglia e calli.

Il batterio *A. tumefaciens* è l'agente eziologico del cancro o galla del colletto ed è in grado di determinare l'insorgenza di tale patologia - a livello delle radici o del colletto - attraverso il trasferimento di una breve sequenza di DNA plasmidico (T-DNA) nel genoma della pianta infetta. Il T-DNA deriva, appunto, dal plasmide extracromosomico presente all'interno dei batteri, denominato Ti (*Tumor inducing*); l'introduzione del T-DNA all'interno di una cellula vegetale necessita sia praticata una lesione nei tessuti della pianta, così da esporre le membrane cellulari delle cellule vegetali all'attacco batterico. Inoltre, le ferite presenti sui tessuti vegetali inducono la produzione di composti fenolici tra cui l'acetosiringone, necessario per l'attivazione dei geni *Vir* del batterio (Gelvin, 2003). Infatti, l'adesione del batterio alle cellule è regolata da alcuni geni del cromosoma batterico, mentre il processo infettivo è presieduto da 35 geni *Vir* presenti nel plasmide Ti. Una volta avviato il processo infettivo, avverrà l'integrazione al nucleo della cellula vegetale di una o più copie di T-DNA che, singolarmente, contiene un quantitativo di geni minore rispetto al plasmide intero, cioè 13 geni. Entrando

nello specifico dei 13 geni, due di questi codificano per enzimi della biosintesi dell'auxina, mentre uno di questi codifica per un enzima della biosintesi della citochinina. L'induzione della moltiplicazione delle cellule vegetali e la formazione di neoplasie (tumori) è dovuta, evidentemente, alla sintesi dei due fitormoni sopracitati. Invece, gli altri geni governano ulteriori aspetti legati alla formazione del tumore o la produzione di sostanze specifiche da sfruttare come fonti di elementi chimici. Avviata la formazione del tumore, i batteri si moltiplicheranno negli spazi intercellulari dello stesso.

I plasmidi che servono da vettori per la trasformazione genetica delle piante sono stati derivati dal plasmide Ti del *A. tumefaciens*. Inoltre, al fine di rendere possibile l'attuazione dei protocolli di trasformazione genetica delle piante, è di cruciale importanza disarmare i vettori di trasformazione, cioè i plasmidi; sostanzialmente, si tratta di operare l'eliminazione dei geni originari presenti tra i bordi destro e sinistro del T-DNA, soppiantandoli con quelli di nostro interesse (contenuti in un costrutto genico). Tale intervento, impedirà di fatto l'insorgenza di neoplasie (Lorenzetti et al., 2018). Le condizioni di incubazione durante il processo infettivo (pH, temperatura e condizioni osmotiche) ed il periodo di co-coltura con il tessuto impiegato per la trasformazione sono fattori che potrebbero condizionare la virulenza dei vari ceppi di *A. tumefaciens* (Alt-Morbe et al., 1989).

I costrutti genici risultano dall'assemblaggio di più sequenze geniche in una o due molecole di DNA attraverso l'azione di specifici enzimi di restrizione e di ligaggio, o tramite reazione di ricombinazione di siti *att*, come nei vettori gateway (Nakagawa et al., 2007). In un'ottica d'insieme, risulta opportuno inserire nel costrutto genico un promotore, cioè una segmento di DNA situato a monte di una regione di DNA codificante e che controlla l'espressione del gene di interesse; una sequenza codificante, ossia una sequenza polinucleotidica che codifica per un prodotto in grado di introdurre un nuovo tratto o una variazione di un carattere di interesse; il terminatore, ovvero una sequenza di DNA che sancisce la cessazione della trascrizione della sequenza codificante; il gene marcatore, appartenente alla categoria dei geni marcatori di selezione, i quali eliminano tutte le cellule che non hanno subito l'evento di trasformazione, favorendo così la rigenerazione di quelle che hanno incorporato il gene d'interesse (ad esempio, gene per la resistenza ad antibiotici o ad erbicidi), oppure dei geni marcatori reporter, i quali rendono plausibile l'identificazione delle cellule e dei tessuti che hanno subito l'evento di trasformazione (ad esempio, GUS o GFP) (Testolin et al., 2012).

Collateralmente ad un efficace metodo di trasformazione, la chiave per sviluppare con successo una cultivar di fragola geneticamente modificata- così come qualsiasi altra pianta, anche da frutto - è essere provvisti di un protocollo genotipo-specifico di rigenerazione in vitro



a partire da tessuti somatici, quali lamine fogliari o internodi di germogli cresciuti in vitro, ma anche di un protocollo di selezione in grado di rintracciare i nuovi rigenerati con eventi di trasformazione stabili e omogenei. Il genotipo rappresenta un elemento essenziale poiché il protocollo elaborato per una cultivar risulta spesso non adeguato per altre cultivar della stessa specie (Mezzetti and Gentile, 2005; Qin et al., 2008; Cappelletti et al., 2015).

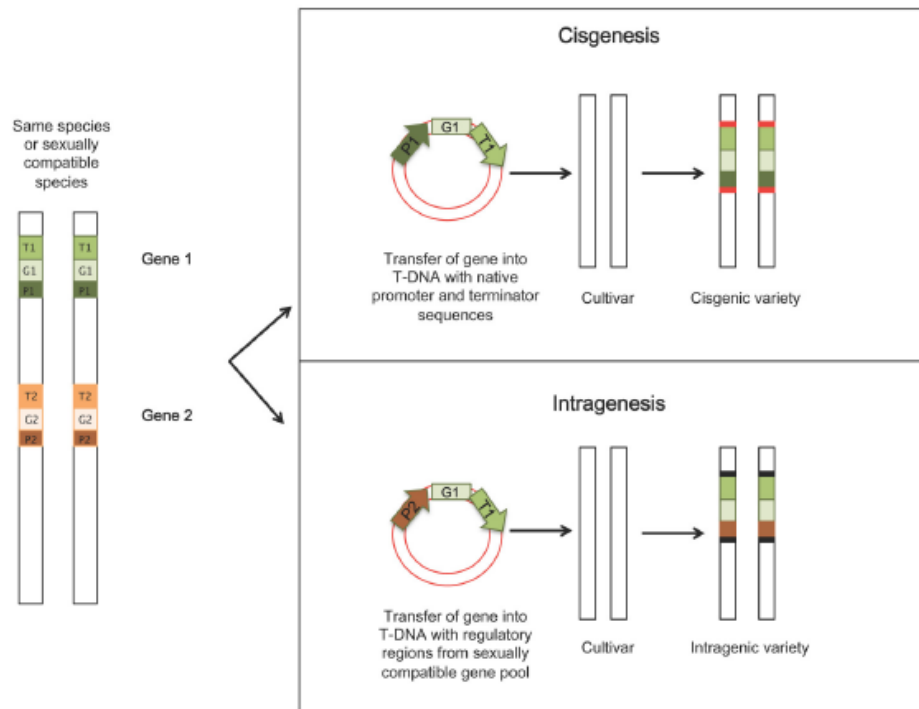
Dunque, la selezione e la rigenerazione rappresentano l'ultima fase critica della trasformazione genetica, infatti i tessuti sottoposti al trattamento vengono posti a rigenerare su un terreno di coltura selettivo, in modo che solo le cellule che hanno incorporato il gene d'interesse possano svilupparsi. Nella fase oggetto di trattazione subentra il ruolo del gene marcatore e, in particolare, i marcatori comunemente impiegati sono il gene per la *neomicina fosfotransferasi II (nptII)* la quale conferisce resistenza agli antibiotici come la kanamicina. Di fatti, l'ottenimento di piante stabili geneticamente trasformate è strettamente correlato anche alla pressione selettiva esercitata dall'antibiotico (kanamicina), a partire dalla fase iniziale della rigenerazione del tessuto fogliare, immediatamente successiva all'infezione da *Agrobacterium* e la co-coltura, includendo la proliferazione in vitro e la radicazione dei germogli appena selezionati. In base all'efficienza del protocollo di rigenerazione, la prima linea transgenica stabile potrà essere disponibile dopo 5-6 mesi dal primo trattamento di trasformazione. Oltre alla tipologia di gene marcatore precedentemente trattata, è necessario rimarcare l'esistenza del gene codificante GFP (*Green Fluorescent Protein*), che consentirebbe all'operatore di visualizzare eventi di trasformazione più rapidamente (in condizioni di luce ultravioletta), di eliminare eventuali "escape" (germogli non trasformati in grado di rigenerare anche in presenza di antibiotico nel mezzo di coltura) e di ridurre la rigenerazione di chimere (germogli composti da cellule trasformate e non).

### 3.6 Cisgenesi ed intragenesi

Alla luce del clima di preoccupazione e scetticismo generato dall'opinione pubblica rispetto alle questioni inerenti la sicurezza delle colture transgeniche, le tecniche di trasferimento di geni denominate cisgenesi ed intragenesi sono state realizzate e sviluppate come alternativa all'applicazione della transgenesi finalizzata al miglioramento genetico delle colture agrarie. Concettualmente, le tecniche sopracitate sono basate esclusivamente sull'impiego di materiale genetico proveniente da una specie identica a quella oggetto di trasferimento di geni o materiale genetico derivante da una specie sessualmente compatibile (Schouten et al., 2006). Evidentemente, quanto appena esposto appare essere in contrasto con la transgenesi, tecnica mediante la quale è possibile trasferire geni o sequenze nucleotidiche a

specie molto differenti. Per giunta, il *pool* genico sfruttato per dare luogo a piante cisgeniche o intrageniche è sostanzialmente identico a quello utilizzato per le operazioni di breeding tradizionale (Holme et al., 2013; Espinoza et al., 2013).

La cisgenesi applicata alle specie vegetali di interesse agrario impiega le conoscenze sviluppate nel tempo per l'ottenimento di piante transgeniche, introducendo però un nuovo criterio alla base dell'individuazione del gene da inserire; infatti, in questo caso, si tratta di una copia di gene nativo comprensivo di promotore e terminatore nativi, proveniente dalla stessa specie o specie sessualmente compatibile con la varietà che si desidera trasformare (Schouten et al., 2006). D'altro canto, per intragenesi applicata alle colture agrarie si intende un intervento meno restrittivo, cioè le sequenze impiegate derivano anch'esse dal pool genico delle specie sessualmente compatibili, dopodiché vengono assemblate combinando sequenze codificanti e di controllo al fine di ottenere il tipo di espressione desiderato o il silenziamento di un gene. Inoltre, i bordi sinistro e destro del T-DNA di *Agrobacterium* sono sostituiti da sequenze identiche che si trovano nelle piante; così facendo, il T-DNA sarà ridenominato P-DNA (dove P sta per pianta) (Lorenzetti et al., 2018) (Figura 9).



**Figura 9: Illustrazione dei principi dell'ottenimento di piante cisgeniche e intrageniche (Limer et al., 2017).**

Le piante derivanti da cisgenesi sono in grado potenzialmente di superare i limiti che ostacolano il miglioramento genetico delle piante da frutto. A titolo esemplificativo, è possibile citare il caso di un processo mirato all'introgressione di un gene utile derivante da una specie selvatica; in tal caso, non si assiste solamente al trasferimento del gene di interesse alle progenie, ma anche di un segmento di regione del DNA delle specie portatrice del tratto genico ricercato (fenomeno del *linkage drag*). Ciò forza i miglioratori ad attuare numerose generazioni di reincrocio per minimizzare l'effetto indesiderato del genoma selvatico. La cisgenesi consente di evitare tali problematiche e di inserire il singolo gene nel patrimonio genetico di una varietà senza condizionarne lo standard qualitativo (Sansavini e Dondini, 2016). In aggiunta al vantaggio esposto precedentemente, si rende necessario rimarcare il risparmio di tempo dovuto alla possibilità di introdurre nella pianta ricevente solo il gene di interesse tramite cisgenesi, a differenza dei programmi di incrocio e selezione classici in cui servono molte generazioni per eliminare i geni indesiderati. Le tecniche di cisgenesi/intragenesi sono state applicate per produrre piante di fragola coltivata al fine di migliorare alcuni caratteri, ma sono state adottate anche su differenti specie da frutto, tra cui il melo; nel caso specifico del melo, Kost et al., (2015) hanno realizzato una linea cisgenica di

*Malus x domestica* Borch. resistente a *Erwinia amylovora* (agente del colpo di fuoco batterico) utilizzando un cisgene proveniente dalla specie selvatica *Malus x robusta* 5.

L'impiego dell'intragenesi è stato esteso anche al campo della trasformazione genetica, la quale presenta tuttora una scarsa disponibilità di efficienti marcatori di selezione alternativi ai geni marcatori comunemente utilizzati. L'esigenza di individuare dei marcatori di selezione alternativi potrebbe essere soddisfatta dall'impiego del gene reporter intragenico rappresentato dall'allele mutato del gene *MYB* di melo (*Malus x domestica*), identificato da Krens et al., (2015). Un caso di applicazione del gene reporter intragenico *MYB* è stato descritto da Kandel et al., (2016), nel quale il fattore di trascrizione VvMybA1 (ottenuto da *Vitis vinifera*) è stato comparato con i geni reporter *GFP* e *GUS*. Il gene reporter *MybA1* è risultato idoneo al fine di identificare eventi di espressione genica a livello di coltura cellulare (Kandel et al., 2016). L'identificazione dei geni reporter *MYB* è plausibile in ogni specie vegetale, ma non risulta altrettanto facilmente possibile sviluppare sistemi di rigenerazione efficienti che consentano l'applicazione di un solo gene reporter senza l'applicazione di marcatori di selezione (Limerà et al., 2017; Mezzetti and Sabbadini, 2019).

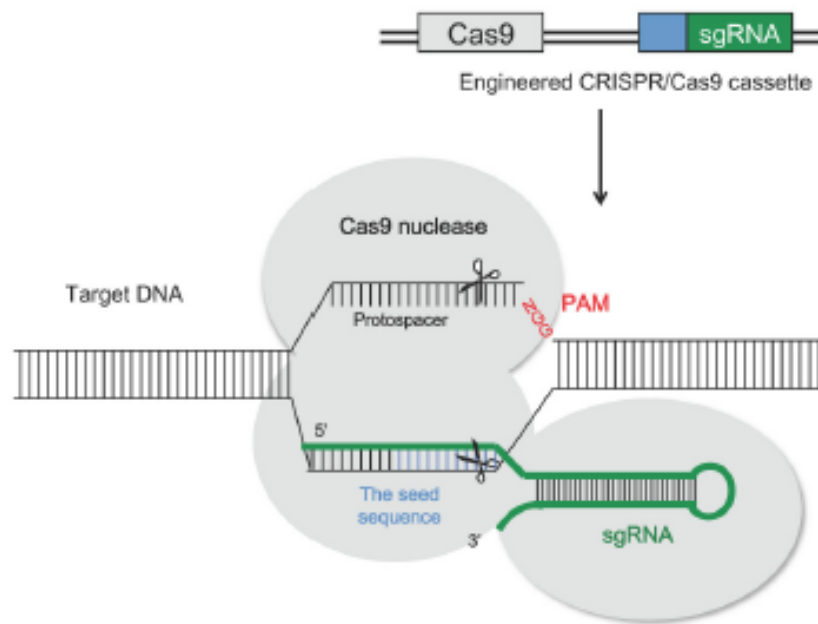
Attualmente, in Europa anche queste tecniche sono disciplinate dalle stesse disposizioni legislative della direttiva 2001/18/CE come DNA ricombinante, sebbene le piante cisgeniche/intrageniche diano maggiori garanzie in termini di sicurezza per la diversa origine rispetto alle piante transgeniche (Mezzetti and Sabbadini, 2019).

### 3.7 Genome editing

Le tecniche di *editing* del genoma sono progredite rapidamente nell'ultimo decennio e, attualmente, rappresentano una delle tipologie di strumenti per la manipolazione genetica delle piante più interessate dalla ricerca in ambito biotecnologico ai fini del consolidamento della resistenza di varie specie vegetali verso determinati patogeni. Il *genome editing* rende possibile la manipolazione di ogni gene delle piante consentendo l'attuazione di integrazione di sequenze nucleotidiche, o delezioni e mutazioni, anche puntiformi, all'interno di una sequenza di interesse (Limerà et al., 2017). Negli ultimi 15 anni è stato possibile assistere all'introduzione di differenti approcci di modificazione sito-specifica del genoma tramite l'impiego di tre tipi di nucleasi ingegnerizzate, ovvero la meganucleasi, nucleasi *Zinc Finger* (ZFN), nucleasi *Transcription Activator-like Effector* (TALEN). Di più recente introduzione è il sistema *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* associato ad un enzima particolare (ad esempio Cas9, dando così luogo al complesso CRISPR/Cas9). Il sistema CRISPR/Cas, sviluppato fra il 2012 e 2013, ha ampiamente preso il sopravvento nel

corso degli anni sulle altre tecniche di *genome editing*, complice il fatto che risulti più semplice da approntare, presenti una maggiore probabilità di successo, una maggiore versatilità e sia meno costosa (Borrelli et al., 2018).

Il sistema CRISPR/Cas è stato scoperto negli anni '80 del secolo scorso in *E. coli* (Ishino et al., 1987) e caratterizzato come sistema immunitario adattivo in molti batteri e archeobatteri, il cui cromosoma ha integrato delle sequenze di origine virale che svolgono una funzione considerata una sorta di equivalente batterico al meccanismo di interferenza a RNA degli eucarioti. Tali sequenze sono quelle cui fa riferimento l'acronimo CRISPR. Relativamente al complesso CRISPR/Cas9, Cas9 sta per "CRISPR-associated protein-9 nuclease" e identifica un enzima ad attività nucleasica individuato per la prima volta nel batterio *Streptococcus pyogenes*. Specificamente, nel momento in cui il DNA estraneo si insinua nel batterio, esso viene degradato dalla nucleasi Cas9. La specificità rispetto al DNA bersaglio è dovuta ad una breve molecola (20 nucleotidi) guida di RNA (crRNA), complementare al DNA estraneo. Però, perché si abbia il corretto riconoscimento del DNA bersaglio, la molecola crRNA deve essere coadiuvata da una breve sequenza aggiuntiva (5'-NGG-3'), denominata PAM (*protospacer adjacent motif*). Dopodiché, un ulteriore breve RNA (tracrRNA, trans-activating RNA) si lega al crRNA, generando un complesso stabile con la proteina Cas9, il quale presenta due domini nucleasici (Cavallini et al., 2016; Morgante and Di Gaspero, 2017). L'applicazione di questo sistema immunitario naturale all'editing del genoma delle piante richiede la creazione di una singola molecola di RNA guida (sgRNA), ottenuto legando l'estremità 3' del crRNA all'estremità 5' del tracrRNA. In questo modo Cas9 viene riprogrammato per indurre la scissione di specifiche sequenze di DNA (Limer et al., 2017). Ponendo nuovamente l'accento sul meccanismo d'azione di CRISPR/Cas9, è cruciale sottolineare che, una volta raggiunto il bersaglio, la nucleasi Cas9 opera un taglio provocando una rottura del doppio filamento di DNA (Figura 10).



**Figura 10: Illustrazione schematica della struttura del sistema CRISPR/Cas9 (Limera et al., 2017).**

Esistono tre categorie di utilizzo dell'endonucleasi Cas9 nell'ambito del *genome editing* applicato alle piante e sono indicate rispettivamente con le sigle SDN-1, SDN-2 e SDN-3, in cui l'acronimo SDN sta per Sito Directed Nuclease. Nel primo sistema la nucleasi effettua il taglio nella molecola di DNA e il meccanismo di riparazione cellulare del DNA provvede a saldare le estremità sfruttando il sistema di riparazione NHEJ (*Non Homologous End Joining*). Nel secondo sistema si impiega, oltre alla nucleasi che esegue il taglio, anche una molecola di DNA esogeno che funge da stampo per ripristinare la lesione. La riparazione della lesione viene guidata dalla molecola esogena ed impiega il sistema denominato HDR (*Homology Directed Repair*). Il terzo sistema si avvantaggia del genome editing multiplex al fine di operare su differenti siti con molteplici molecole di sgRNA affiancate dalla nucleasi Cas9 (Bortesi and Fischer, 2015; Khatodia et al., 2016; Morgante and Di Gasparo, 2017).

Sebbene una delle caratteristiche principali del sistema CRISPR/Cas9 sia l'elevato grado di precisione degli interventi, non è da escludere la probabilità di ottenere mutazioni indesiderate (*off-target*). Nella fattispecie, due sono le mutazioni off-target principalmente evidenziate dai ricercatori: mutazioni in corrispondenza delle regioni del genoma con sequenze particolarmente simili alla sequenza bersaglio oppure inaspettate mutazioni in regioni del genoma non correlate alla regione bersaglio. In tal senso, appaiono più che mai necessarie

delle informazioni complete sulle sequenze del genoma in modo da poter operare delle previsioni su eventuali mutazioni *off-target* (Zischewski et al., 2017; Borrelli et al., 2018).

Il sistema CRISPR/Cas9 è stato applicato in varie specie da frutto. Questa tecnica di *editing* del genoma è stata utilizzata, a titolo esemplificativo, nella fragola ottoploide per colpire il gene omeotico che governa il differenziamento a fiore *APETALA3* (*AP3*). Le linee di fragola sviluppate presentavano stami e frutti sviluppati irregolarmente. Attraverso l'analisi del *locus* mirato è stato possibile riscontrare differenze nell'*editing* genico tra le differenti linee modificate da CRISPR/Cas9 ed anche identificare linee contraddistinte da mutazioni in tutte e otto le copie *AP3* nel genoma della fragola. Tali mutazioni sono risultate stabili in piante clonate mediante stolone, dando prova del mantenimento delle modifiche indotte dall'*editing* genico nella propagazione vegetativa delle piante di fragola (Martin-Pizarro et al., 2019; Mezzetti and Sabbadini, 2019)

Il *genome editing* mediante CRISPR/Cas permetterà di generare in varietà coltivate delle mutazioni favorevoli individuate in specie affini o individui selvatici; tutto ciò avrà modo di avvenire anche senza l'inserimento di nuovi geni ed evitando le classiche pratiche di incrocio e re-incrocio. Tuttavia, in ambito europeo e – a maggior ragione – italiano, la sperimentazione in campo delle colture agrarie su cui si è intervenuti attraverso editing del genoma (in particolare con il complesso CRISPR/Cas) è tuttora ostacolata dagli effetti della sentenza del 25/07/2018 della Corte di Giustizia Europea che equipara le piante ottenute da *editing* del genoma alle piante GM, assoggettando le *New Breeding Techniques* (NBTs) alla direttiva 2001/18/CE (CURIA EUROPA, 2018).

### 3.8 RNA interference (RNAi)

L'RNA interferente (RNAi) è un meccanismo evolutivamente conservato in tutti gli eucarioti, ed ha la funzione di regolare l'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale, in modo sequenza-specifico, attraverso molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA). L'RNAi è stato osservato per la prima volta in pianta nel 1990 quando, nel tentativo di produrre petunie di colore viola, il gene calcione sintasi (*CHS*) venne sovraespresso nella pianta ospite, e questo determinò inaspettatamente la co-soppressione del transgene e del gene *CHS* di petunia, portando ad un fenotipo opposto a quello desiderato, ovvero una pigmentazione bianca del fiore (Napoli et al., 1990). Attualmente, dal punto di vista dell'applicazione in campo, l'approccio RNAi può essere utilizzato come strumento di protezione fitosanitaria delle colture, sia *in planta* attraverso la produzione di piante geneticamente modificate esprimenti dei costrutti a forcina (hairpin) (HIGS, *Host-Induced*

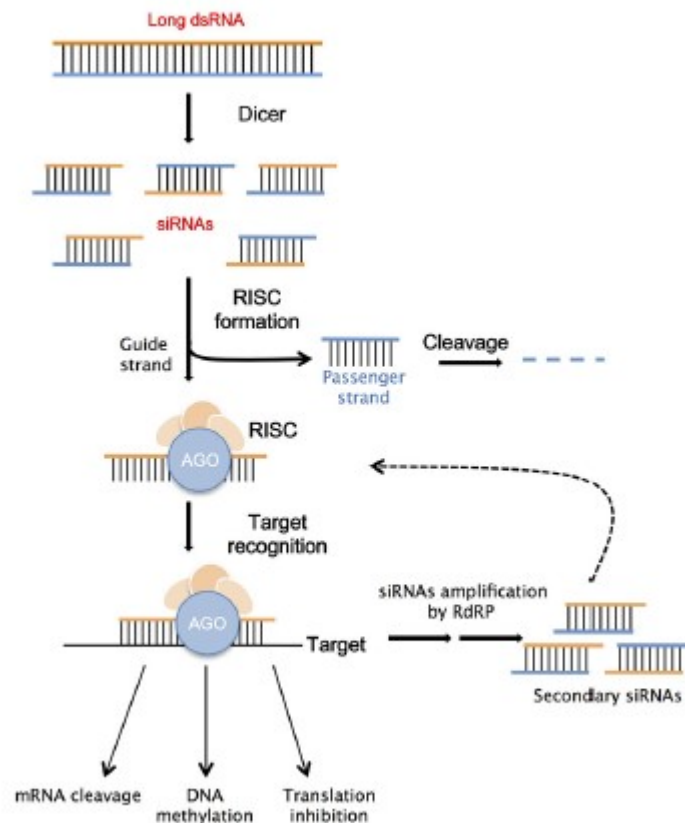
*Gene Silencing*) in grado di attivare un meccanismo RNAi attraverso la produzione stabile di dsRNAs, aventi come target una o più sequenze di un patogeno o insetto (Mezzetti et al., 2020b). In alternativa al precedente approccio, è possibile sfruttare un'altra strategia (SIGS, *Spray-Induced Gene Silencing*) basata sull'applicazione esogena di dsRNA o piccoli RNA a doppio filamento (siRNA), che possono essere stabilizzati attraverso dei formulati (Taning et al., 2019).

Il meccanismo di silenziamento genico è innescato da una molecola di dsRNA che viene processata in una molecola di RNA a doppio filamento costituita da 21-25 nucleotidi (siRNA) nel citoplasma cellulare da parte dell'endonucleasi DICER LIKE e una RNasi sRNA-specifica. La molecola siRNA sarà successivamente inglobata in un complesso enzimatico, cioè il *RNA-induced silencing complex* (RISC), il quale è contraddistinto da una attività endonucleasica per l'inibizione delle molecole di RNA nell'organismo bersaglio. Una volta che la molecola di siRNA sarà stata incorporata nel complesso enzimatico RISC, il filamento di RNA antisenso rimarrà associato a RISC, mentre il filamento senso verrà degradato. Conseguentemente, il complesso RISC verrà attivato e sarà grado di scansionare molti mRNA presenti nel citosol delle cellule dell'organismo bersaglio fino a trovarne uno complementare alla sequenza di RNA antisenso associato al complesso stesso. Se l'appaiamento tra siRNA e mRNA è perfetto, ciò stimolerà l'attività endonucleasica del complesso RISC e causerà la rapida degradazione della molecola di RNA; altrimenti, se l'appaiamento non fosse perfetto, il complesso enzimatico determinerà l'inibizione della traduzione (Figura 11). Pertanto, è possibile affermare che tale meccanismo rappresenti un silenziamento genico post-trascrizionale (Gebremichael et al., 2021). Nonostante i livelli di mRNA diminuiscano sensibilmente in seguito alla summenzionata attività enzimatica, quantitativi residuali potrebbero essere comunque rilevati; per tale motivo il silenziamento di un particolare gene attraverso il meccanismo del RNAi può condurre ad un effetto di *knockdown*, piuttosto che ad un effetto *knockout* (come per il *genome editing*). Tale aspetto è importante quando sono richiesti livelli ridotti di espressione genica anziché un suo completo spegnimento (Wagner et al., 2011). Le piante esperimenti costrutti RNAi, ottenute tramite trasformazione genica della pianta o mediante vettori virali, devono essere sottoposte alle procedure dettate dalle linee regolatorie sugli OGM affinché possa esserne autorizzata la commercializzazione. Tuttavia, a differenza delle classiche piante GM che vengono modificate per esprimere una nuova proteina, con il rischio di produrre possibili allergeni o molecole tossiche, le piante RNAi esprimono dsRNA, e non nuove proteine, per dare origine ad un nuovo fenotipo (Arpaia et al., 2020), facendole



risultare più accettabili dal punto di vista del pubblico, e associate ad un livello di rischio minore (Papadopoulou et al., 2020).

La strategia HIGS è tuttora impiegata per operare studi di genomica funzionale su varie specie vegetali, inclusa la fragola; a titolo esemplificativo, è possibile citare il gruppo di Koskela et al., (2012) che ha utilizzato l'RNAi per determinare i geni coinvolti nel processo di induzione a fiore in *F. vesca*.



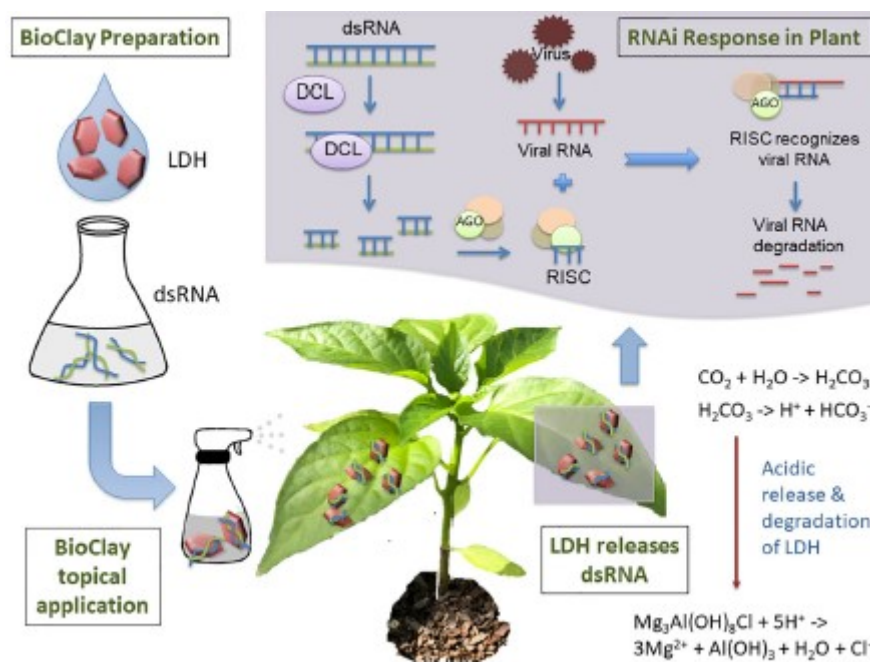
**Figura 11: Illustrazione schematica del meccanismo di funzionamento del RNAi (Limera et al., 2017).**

Nonostante l'efficacia del sistema HIGS, complici principalmente le preoccupazioni politiche -a cui si accodano quelle pubbliche – concernenti la coltivazione e l'uso di colture GM (Lusk et al., 2014), si è favorita la necessità di approntare nuovi prodotti contenenti molecole di dsRNA da applicare esternamente alla pianta (SIGS), evitando così modifiche ereditabili nel patrimonio genetico dell'ospite (Sabbadini et al., 2020c). La soluzione che risponde al nome di SIGS fornisce una efficace protezione delle piante non solo su colture in pre-raccolta, ma anche in post-raccolta (Wang et al., 2017a). Inoltre, le molecole di dsRNA

presenti nei formulati – considerabili come “biopesticidi” – da applicare esogenamente sono sintetizzati da microorganismi o per via enzimatica in vitro; perciò sono differenti dagli agrofarmaci di sintesi e da altri agenti di bio-controllo che emettono proteine come le tossine Cry. Per giunta, i nuovi metodi di produzione di massa di queste molecole hanno diminuito il loro costo di produzione a 0,5-1 \$ al grammo, il che rende competitivi tali prodotti sul mercato (Zotti et al., 2018; Mezzetti et al., 2020b)

Tenendo in considerazione che le molecole di RNA sono molecole naturali e facilmente degradabili nell’ambiente, si rende necessario lo sviluppo di metodi di stabilizzazione in grado di proteggerle da fattori ambientali e enzimi come le RNasi. In tal senso, sono già stati rilasciati lavori di ricerca che indicano come l’incorporazione di molecole di dsRNA in strati di nanomateriale, denominato BioClay, sia in grado di prolungare l’effetto di protezione fino a 20 giorni di trattamento (Mitter et al., 2017; Fletcher et al., 2020) (Figura 12).

Sotto il profilo applicativo, anche nel contesto della fragolicoltura è stato possibile appurare l’efficacia di nuovi formulati ottenuti con il metodo SIGS al fine di contrastare, ad esempio, le infezioni di *B. cinerea* (Wang et al., 2016b; Sabbadini et al., 2021b).



**Figura 12: Illustrazione schematica del funzionamento della strategia SIGS. L'applicazione di BioClay consente una protezione estesa mediata dal RNAi dai vari patogeni delle piante. BioClay è un complesso di RNA a doppio filamento (dsRNA) doppio idrossido stratificato (LDH) (Fletcher et al., 2020).**

# Capitolo 4

## CASI DI APPLICAZIONE DEI METODI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

### 4.1 Premessa

Di seguito si procederà alla trattazione e alla descrizione dei principali aspetti di alcuni casi studio riguardanti l'implementazione di programmi di miglioramento genetico oppure casi di applicazione di determinati approcci biotecnologici di supporto al breeding della fragola coltivata mirati all'ottenimento di genotipi contraddistinti da una espressione maggiormente efficace di specifici caratteri presi in esame in questo elaborato di tesi. D'altro canto, il progresso del miglioramento genetico di *F. x ananassa*, così come di altre specie vegetali coltivate, procede anche per merito dell'acquisizione di nuove conoscenze validate dalla comunità scientifica; tali nuove acquisizioni, relative nella fattispecie ai caratteri esaminati in questo elaborato, sono frutto anche dell'implementazione di alcune soluzioni biotecnologiche di supporto al breeding, le quali consentono di rendere più rapida e puntuale l'introduzione di specifici geni nel genoma delle piante coltivate rispetto ai metodi di breeding tradizionale.

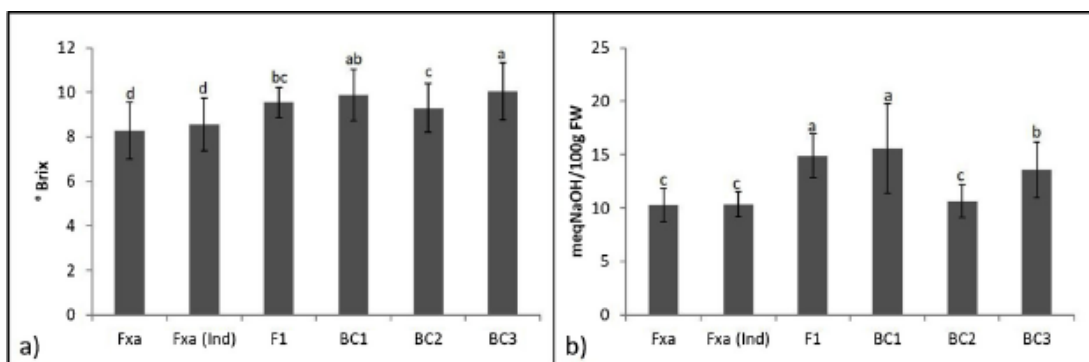
### 4.2 Miglioramento della qualità nutrizionale

#### 4.2.1 *Valutazione della qualità sensoriale e nutrizionale di genotipi di fragola coltivati in condizioni di resilienza*

Il lavoro di ricerca realizzato da Mazzoni et al. (2019a) rappresenta un esempio di studio condotto valutando i progressi raggiunti nell'ambito di un programma di breeding finalizzato all'ottenimento di migliori qualità nutrizionali, mantenendo, al contempo, adeguati livelli produttivi e parametri sensoriali. Nella fattispecie, lo scopo che gli autori della pubblicazione si sono prefissati è la valutazione dei progressi conseguiti nel programma di breeding in termini di parametri produttivi (resa commerciale/pianta) e qualità sensoriale (peso medio dei frutti, solidi solubili e acidità titolabile). Tra i genotipi ottenuti, i più interessanti sono stati selezionati e analizzati per i parametri nutrizionali (TAC, Contenuto Fenolico Totale e Totale Contenuto Antociani Totale, Vitamina C, Antociani specifici e Acidi Fenolici specifici tramite HPLC).

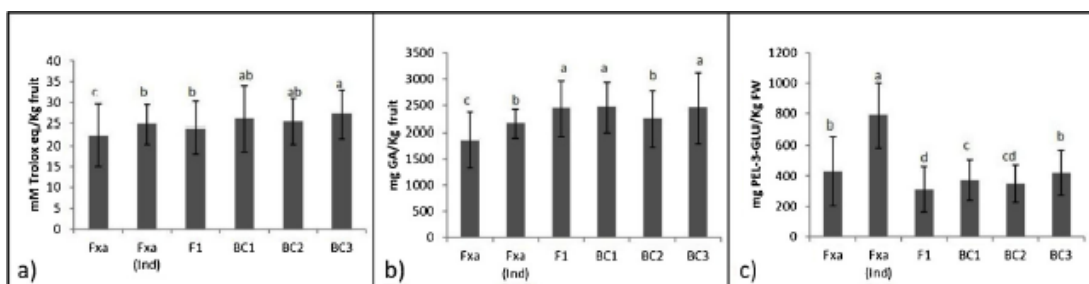
Al fine di inquadrare chiaramente l'entità del materiale vegetale valutato nella prova sperimentale, si ritiene necessario precisare che i genotipi selezionati provenienti da 3 generazioni di backcross (BC1, BC2, BC3) ottenute dagli incroci interspecifici tra *F. x ananassa* F1 (Fxa) x *F. virginiana glauca* (FVG), genotipi di *F. x ananassa* in stato avanzato di selezione ed, infine, genotipi di *Fragaria x ananassa* selezionati per la trasformazione industriale (per la colorazione rosso scuro) sono stati coltivati per tre cicli produttivi nel campo sperimentale ubicato presso la Fattoria Didattica-Sperimentale UNIVPM "P. Rosati" ad Agugliano, Italia. Inoltre, la selezione dei genotipi di rilievo da sottoporre ad approfonditi studi sulle qualità nutrizionali è stata condotta sulla base di valutazioni dei dati legati ai parametri sensoriali e osservazioni in campo.

Ponendo maggiormente l'accento sugli esiti delle osservazioni sperimentali e sui risultati ottenuti dalle analisi di laboratorio, è, anzitutto, essenziale evidenziare l'utilità dell'applicazione molteplice del reincrocio, in quanto la presenza germoplasma selvatico negli schemi di ibridazione interspecifica ha sensibilmente diminuito il peso medio dei frutti. Tale implicazione negativa è stata, appunto, contenuta attraverso reiterate generazioni di backcross con genotipi di fragola coltivata (Fxa) in modo tale da ripristinare adeguati livelli di resa commerciale/pianta dalla generazione BC2 in avanti. Le osservazioni sul peso medio dei frutti ottenuti dalle generazioni BC1 e BC2 hanno effettivamente confermato ciò che era stato già prospettato da passate pubblicazioni relative all'introduzione di germoplasma selvatico nei programmi di breeding (Diamanti et al., 2012). La principale inferenza compiuta, una volta terminate le opportune analisi, è stata che i solidi solubili (SS) e l'acidità titolabile (TA) sono state interessate da un aumento per merito dell'impiego di genotipi selvatici di FVG, in cui la concentrazione di solidi solubili e l'acidità titolabile sono maggiori (Diamanti et al., 2012); per di più, l'utilizzo di opportuni parentali nell'ambito di programmi di ibridazione interspecifica ha implicato, contestualmente ad un adeguato mantenimento di un alto tenore di SS, anche una riduzione del livello di TA. Infatti, nella generazione BC3 è stato possibile ottenere dei frutti caratterizzati da notevoli valori in termini di solidi solubili e, allo stesso tempo, ridotti livelli di acidità titolabile, dando luogo ad una migliore percezione sensoriale per il consumatore (Figura 13).



**Figura 13: a) Solidi Solubili (SS) e b) Acidità Titolabile (TA) per diversi tipi di incrocio. I dati sono espressi come medie triennali  $\pm$  errori standard. Lettere diverse indicano differenze significative per  $p < 0,05$  (test SNK) (Mazzoni et al., 2019a).**

Dunque, i risultati del programma di reincrocio, di cui sono stati descritti i tratti principali, sottolineano le caratteristiche positive sotto il profilo nutrizionale e sensoriale della generazione BC3 rispetto al genotipo Fxa e alla generazione F1. Inoltre, la resa per pianta non appare molto distante dai requisiti commerciali richiesti; di fatti, mediante ulteriori incroci con un parentale Fxa sarebbe stato possibile accrescere il peso medio dei frutti. Per giunta, la generazione BC3 ha evidenziato i più alti livelli di TAC e, di conseguenza, di TPH, suffragando così la validità del programma di backcross condotto al fine di ottenere un aumento dei parametri di qualità nutrizionale dei frutti della generazione BC3 (Figura 14).



**Figura 14: a) Capacità antiossidante totale (TAC), b) Contenuto fenolico totale (TPH) e c) Contenuto totale di antociani (ACY) per diversi tipi di incrocio. I dati sono espressi come medie triennali  $\pm$  errori standard. Lettere diverse indicano differenze significative per  $p < 0,05$  (test SNK) (Mazzoni et al., 2019a).**

Risulta, però, importante specificare che i valori di un ulteriore componente della qualità nutrizionale, cioè la vitamina C, sono apparsi statisticamente simili a quelli dei genotipi commerciali Fxa e della generazione F1 (contraddistinta dal 50% del germoplasma selvatico).

#### 4.2.2 *Variazione nel contenuto di polifenoli e vitamina C della fragola indotta dal programma di breeding*

Un altro esempio di lavoro di ricerca condotto valutando le caratteristiche di numerose cultivar e genotipi selezionati nell'ambito di un programma di breeding finalizzato all'ottenimento di migliori qualità nutrizionali è rappresentato dallo studio realizzato da Mazzoni et al. (2021c). Lo scopo essenziale dello studio trattato è compiere delle valutazioni approfondite sulle qualità nutrizionali dei frutti prodotti da 14 cultivar di fragola coltivata e da 5 genotipi in stadio avanzato di selezione ottenuti da un programma di breeding. È necessario precisare che le concentrazioni dei principali composti bioattivi, come antociani, acidi fenolici, e vitamina C, sono state misurate mediante HPLC-UV.

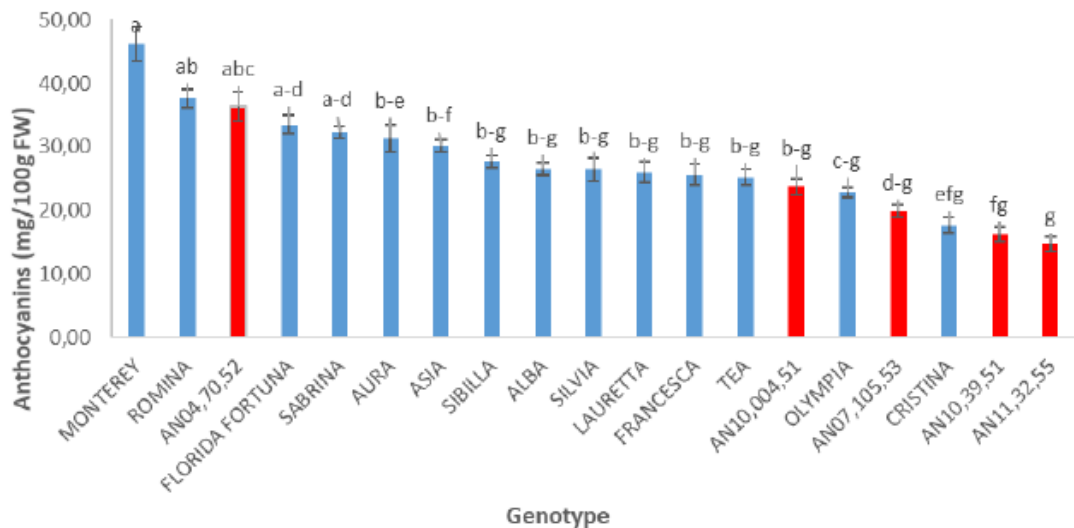
Procedendo ad una analisi più dettagliata dello studio, si rileva che le 14 cultivar e le 5 nuove selezioni di fragola ottenute dal programma di breeding condotto da autori afferenti al D3A- UNIVPM, sono state coltivate per tre anni consecutivi, dal 2016 al 2018 in un campo sperimentale non fumigato presso la Fattoria Didattica-Sperimentale "P. Rosati" dell'Università Politecnica delle Marche, con sede ad Agugliano, Italia. Inoltre, la coltivazione di ogni cultivar o selezione è avvenuta in condizioni di pieno campo ed in un'unica parcella sperimentale di 6 piante ciascuna, gestite secondo i principi della produzione integrata e raccolte nel maggio dell'anno successivo.

Relativamente ai fattori della qualità nutrizionale dei frutti delle fragole coltivate, tale pubblicazione descrive la variazione nel contenuto di polifenoli e vitamina C. Fondamentale constatare che alla capacità antiossidante totale delle fragole contribuiscono sia la vitamina C che i composti fenolici, poiché questi composti bioattivi sono in grado di agire come antiossidanti (Schijlen et al., 2006).

Una delle caratteristiche commerciali tenute in considerazione nel miglioramento genetico della fragola è la pigmentazione rossa nelle sue varie gradazioni ed essa è correlata anche al tenore di antociani rilevato nei frutti. Per di più, è noto che un aumento della concentrazione di antociani, nonostante il beneficio apportato alla salute, potrebbe generare frutti più scuri, e il loro valore di mercato potrebbe diminuire se il colore virasse eccessivamente verso il nero. Le analisi di laboratorio del contenuto di antociani nei frutti delle cultivar e delle nuove selezioni oggetto di esame nello studio in questione indicano che le cultivar presentavano un contenuto di antociani più elevato rispetto alle selezioni.

Restringendo il campo alle sole cultivar valutate, quelle che hanno mostrato il contenuto medio di antociani di maggior rilievo sono individuabili in "Monterey" e "Romina", con 46,2 e 37,65 mg 100 g<sup>-1</sup> FW, rispettivamente (Figura 15). Per quanto riguarda le cinque selezioni

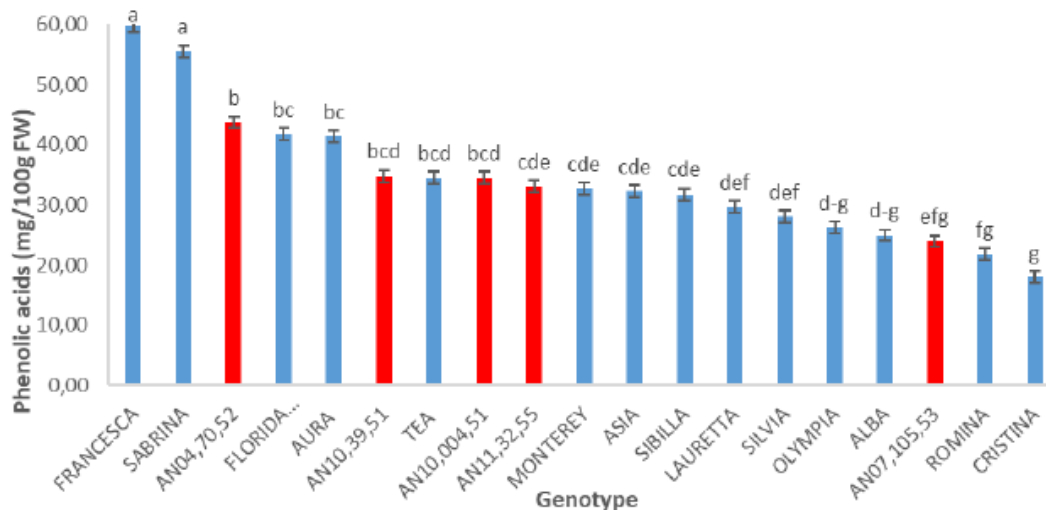
studiate, “AN04,70,52” è risultata con un'elevata quantità di antociani (36,37 mg 100 g<sup>-1</sup> FW), mentre le altre selezioni si sono rivelate meno interessanti per questo parametro.



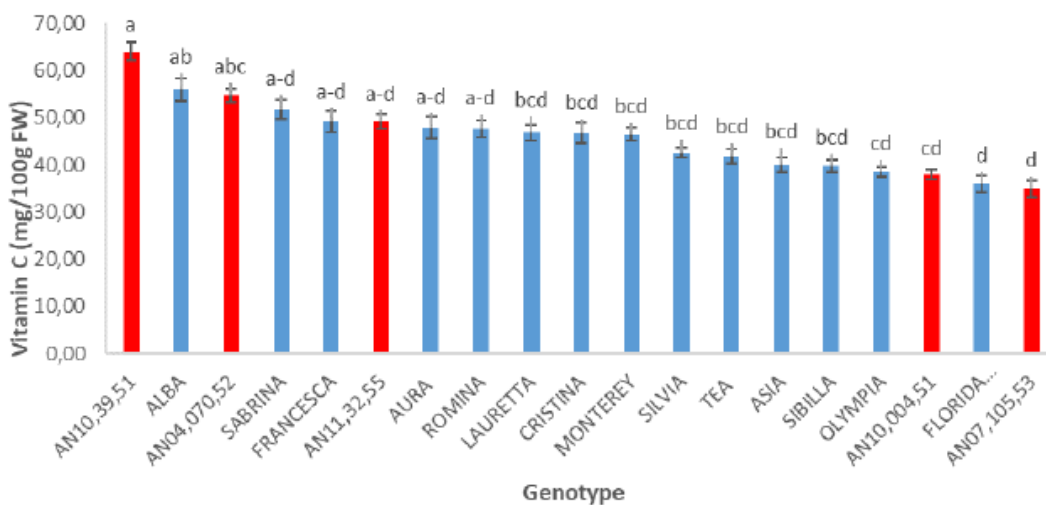
**Figura 15: Contenuto in antociani delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espresso in mg di antociani 100 g<sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD,  $p \leq 0,05$ ) (Mazzoni et al., 2021c).**

Inoltre, sotto il profilo del contenuto di acidi fenolici, le analisi hanno cristallizzato una condizione degna di nota, ossia le selezioni, tendenzialmente, hanno presentato un tenore maggiore di acidi fenolici rispetto alle cultivar. La cv. “Francesca” con 59,61 mg 100 g<sup>-1</sup>, ha presentato la più alta quantità di acidi fenolici e si è distinta rispetto a tutte le altre cultivar, mentre il nuovo genotipo selezionato “AN04,70,52”, con 43.69 mg 100 g<sup>-1</sup>, ha presentato il più elevato quantitativo di acidi fenolici tra le selezioni (Figura 16).

Relativamente ai contenuti di vitamina C, le analisi di laboratorio indicano che i quantitativi di questa vitamina nelle selezioni e nelle cultivar sono simili, constatazioni che testimoniano il conseguimento di risultati soddisfacenti per il programma di breeding D3A-UNIVPM (Figura 17).



**Figura 16:** Acidi fenolici delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espressi in mg di acidi fenolici 100 g<sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD, p≤0,05) (Mazzoni et al., 2021c).



**Figura 17:** Contenuto di vitamina C delle cinque nuove selezioni di fragole (colonne rosse) e 14 cultivar (colonne blu), espresso in mg di vitamina C 100 g<sup>-1</sup> peso fresco. I valori sono espressi come medie ± deviazione standard. Lettere diverse indicano differenze statistiche (test LSD, p≤0,05) (Mazzoni et al., 2021c).

In conclusione, si ritiene opportuno evidenziare che il programma di breeding è riuscito nell'intento di costituire un nuovo genotipo caratterizzato da un maggiore contenuto di vitamina C, acidi fenolici e antociani ("AN04,70,52"). Se il genotipo "AN04,70,52"



confermasse il suo valore in termini di parametri produttivi e sensoriali, potrebbe essere candidato a nuova cultivar da immettere sul mercato.

#### 4.3 Acquisizioni sulla natura del carattere della rifioritura

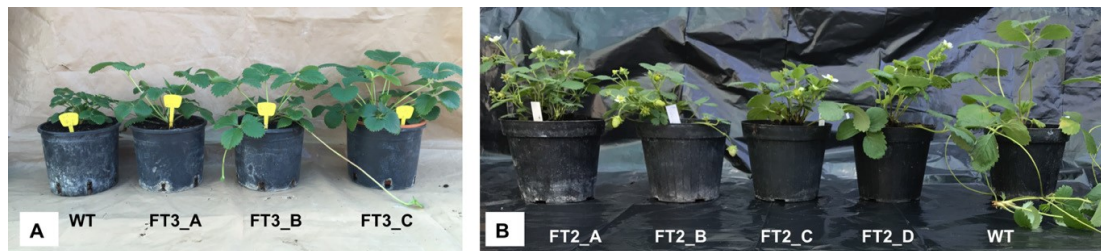
La costituzione di cultivar ottoploidi commerciali rifioriti e di un livello qualitativo importante persiste come uno degli obiettivi del miglioramento genetico ma, allo stato attuale, non risulta così facilmente raggiungibile attraverso l'implementazione di approcci di breeding convenzionali. Questa è la ragione principe per cui si ritiene cruciale prendere in considerazione le nuove tecniche genomiche, le quali permetterebbero più agevolmente di introdurre il carattere rifiorito nella fragola coltivata.

A titolo esemplificativo, è possibile constatare l'applicazione delle sopracitate tecniche molecolari nello studio condotto da Sabbadini et al. (2021d), il cui scopo mira all'ottenimento di linee transgeniche della cultivar ottoploide unifera brevidiurna "Sveva", overesprimenti i geni *FveFT2* o *FveFT3*; questo intervento di trasformazione genetica è rivolto alla validazione del ruolo di tali geni e delle loro funzionalità nel controllo della fioritura della fragola ottoploide e dell'effetto sul fenotipo nelle linee trasformate. Inoltre, al fine di consentire l'attuazione della trasformazione genetica in vitro mediata da *Agrobacterium tumefaciens* e della rigenerazione delle piante putativamente trasformate, un protocollo apposito è stato sviluppato e ottimizzato. Quindi, una volta prodotte le linee transgeniche, esse sono state trasferite e coltivate in serra per una fenotipizzazione preliminare.

Per quanto concerne le prove di trasformazione genetica, si sottolinea l'utilizzo del ceppo *A. tumefaciens* GV3101 contenente il plasmide pK7WG2D; il plasmide pK7WG2D contiene il gene marcatore per la selezione *nptII* -che conferisce resistenza all'antibiotico kanamicina - e il gene reporter codificante la *Green Fluorescent Protein* (GFP), combinati con le sequenze genetiche *FveFT2* o *FveFT3*, la cui trascrizione viene controllata dal promotore 35S (Gaston et al., 2021). Per di più, tali prove di trasformazione genetica sono state svolte utilizzando 200 espianti per ogni costrutto - derivanti dalla propagazione in vitro di piante di *F. × ananassa* cv. "Sveva" -, implementando il protocollo di trasformazione e rigenerazione redatto da Cappelletti et al. (2015).

Durante le fasi di rigenerazione e selezione, è stato costantemente monitorata il tipo di attività morfogenica di ogni espianto fogliare. Dopodiché, i germogli rigenerati esprimenti la GFP sono stati isolati e trasferiti in tubi di vetro contenenti un substrato di proliferazione addizionato con l'agente di selezione kanamicina (50 mg L<sup>-1</sup>) e cefatoxime (200 mg L<sup>-1</sup>). Successivamente, le linee proliferanti stabili sono state trasferite nel substrato di radicazione

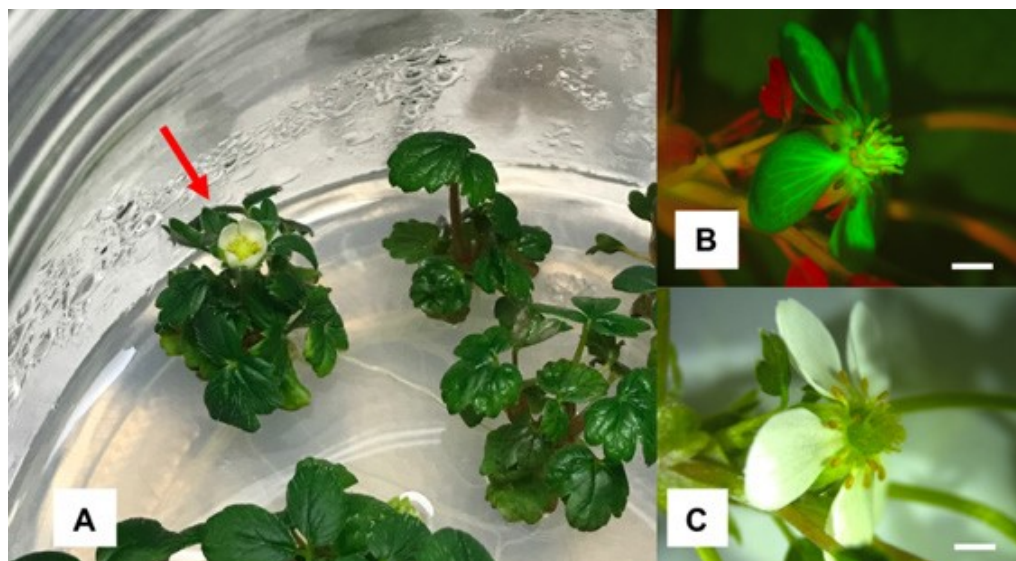
e la loro risposta in presenza di kanamicina è stata assunta come una seconda prova dell'identificazione di presunte linee transgeniche. Pertanto, solo i germogli rigenerati che hanno superato la fase finale della selezione sul substrato con kanamicina sono stati considerati come nuove linee transgeniche e sono stati destinati all'allungamento in vitro e acclimatati in vivo. Quattro mesi dopo l'acclimatamento in vivo, sono stati rilevati dei dati preliminari sul fenotipo delle piante afferenti sia alle linee transgeniche che a quelle di controllo (Figura 18).



**Figura 18: A) “Sveva” WT a confronto con tre linee che sovraesprimono il gene *FveFT3* sei mesi dopo il trasferimento in vivo; B) Esempio di quattro linee indipendenti sovraesprimenti il gene *FveFT2* a confronto con “Sveva” WT quattro mesi dopo il trasferimento in vivo (Sabbadini et al., 2021d).**

I risultati presentati in questo studio confermano l'importanza di utilizzare strumenti biotecnologici per la validazione e gli studi sul genoma funzionale e sui complessi meccanismi di regolazione vegetativa e di fioritura delle piante nella fragola (*Fragaria × ananassa* Duch.).

In conclusione, è stato possibile constatare come il protocollo di trasformazione mediato da *Agrobacterium* abbia permesso di generare nuove linee transgeniche di cv. “Sveva” in grado di sovraesprimere i geni *FveFT2* e *FveFT3*. Complessivamente, è stata registrata la produzione di un totale di quattro e tre linee transgeniche rispettivamente dalle prove di trasformazione basate sui costrutti *35S::FveFT2* e *35S::FveFT3*. Inoltre, tra le linee overesprimenti *FveFT2* lo sviluppo dei fiori è stato osservato già durante la fase di proliferazione in vitro (Figura 19).



**Figura 19: Linea transgenica "Sveva" che sovraesprime il gene *FveFT2*. A) Fiore sviluppato da un germoglio coltivato su substrato di proliferazione indicato dalla freccia rossa; B) fiore fluorescente (con GFP) sviluppato da un germoglio in vitro fotografato sotto raggi UV; e C) luce bianca (bar = 2 mm) (Sabbadini et al., 2021d).**

Inoltre, da un'analisi dei risultati ottenuti in via preliminare dallo studio, emerge un ruolo opposto da attribuire ai due geni nell'equilibrio tra modalità di riproduzione sessuale e asessuale. Infatti, il gene *FveFT2* risulta essere promotore della fioritura (confermato anche in fragola diploide *F. vesca*, da Gaston et al., 2021), mentre il gene *FveFT3* favorisce la capacità stolonifera. Le linee citate precedentemente rappresentano un nuovo materiale genetico su cui fondare ulteriori studi funzionali e fenotipici volti ad inquadrare più precisamente il ruolo di questi geni nel controllo della fioritura delle piante e dello sviluppo vegetativo. La conoscenza della funzionalità di tali geni è cruciale al fine di comprendere come rendere più rapida la costituzione di nuove cultivar commerciali di fragola rifiorante in grado di garantire elevati standard quali-quantitativi. Dunque, in estrema sintesi, appare evidente come l'analisi approfondita dei geni *FT* sia essenziale per stabilire i loro ruoli nell'ambito della fioritura e come la loro regolazione sia correlata al gene *TFL1* (Gaston et al., 2021). A tal proposito, una migliore comprensione degli aspetti più sottili di questa complessa regolazione risulta quindi accessibile mediante la produzione di linee transgeniche caratterizzate da diversi livelli di espressione di ciascun gene.

#### 4.4 Miglioramento della resistenza alle avversità parassitarie

Il conseguimento della resistenza genetica a specifici patogeni responsabili di patologie particolarmente aggressive nei fragoleti rappresenta un obiettivo in un certo senso trasversale tra i programmi di miglioramento genetico di varie colture agrarie, sostanzialmente uno dei più attenzionati e ricercati. La via più rappresentativa rivolta all'introduzione di tratti genetici che conferiscano tolleranza ad una determinata patologia, in ambito fragolicolo, è identificabile nel breeding convenzionale; risulta altrettanto necessario ribadire che tale concreta possibilità è affiancata anche da altre soluzioni, come l'impiego di differenti approcci biotecnologici, che però non godono di una situazione normativa favorevole che consenta di verificare appieno la loro validità ed efficacia attraverso sperimentazioni in campo.

Un caso di applicazione di uno di questi approcci innovativi è rappresentato dallo studio realizzato da Sabbadini et al. (2021b); lo studio in questione si è focalizzato specificamente sul conferimento della tolleranza genetica alle infezioni del patogeno fungino *Botrytis cinerea*, convalidando l'efficacia dell'espressione stabile in pianta (HIGS) di sequenze di RNAi indirizzate ai geni *Dicer Like 1* e *2* solo di *Botrytis cinerea* (Bc *DCL1/2*) o ai geni *DCL* di entrambi i patogeni *B. cinerea* e *Verticillium dahliae* (Bc+Vd *DCL1/2*). Entrambi i costrutti sono stati sviluppati e validati precedentemente mediante HIGS in *Arabidopsis* e mediante SIGS su vari organi e tessuti di diverse specie vegetali, inclusa fragola (Wang et al., 2016b). In questo modo sono state prodotte nuove linee transgeniche putative di due cultivar di fragola coltivata. Inoltre, è stata sottoposta ad una validazione in via preliminare l'efficacia dell'applicazione esogena (SIGS) delle medesime sequenze di RNAi su piante di fragola coltivate in vaso in condizioni di serra, al fine di inibire la virulenza dello stesso patogeno, ossia *B. cinerea*.

I geni *DCL1/2* di *Botrytis cinerea* e *Verticillium dahliae* codificano per enzimi chiave per la sintesi dei dsRNA e la conseguente produzione di siRNA nei due patogeni che inducono il silenziamento di geni di resistenza nella cellula vegetale ospite. La limitazione dell'infezione di questi due patogeni può, appunto, essere determinata dal silenziamento dei geni *DCL1/2* (Wang et al., 2016b).

Al fine di garantire l'espressione stabile di RNAi nelle cultivar di fragola e, quindi, applicare il sistema HIGS, si è resa necessaria l'implementazione di un protocollo di trasformazione genetica impiegando il ceppo GV3101 di *A. tumefaciens* ingegnerizzato con un plasmide contenente il gene *Bc-DCL1/2* oppure contenente i geni *Bc-DCL1/2* + *Vd-DCL1/2*. In aggiunta alle sequenze RNAi, il costrutto genico nei plasmidi esprime anche il gene marcatore per la selezione, *nptII*.

Entrando maggiormente nel dettaglio del disegno sperimentale, l'infezione con il ceppo GV3101 di *Agrobacterium tumefaciens* è stata condotta complessivamente su 400 foglie di fragola per ciascuna delle due cultivar di fragola "Sveva" e "Romina", di cui 200 sottoposte al costrutto genico *Bc-DCL1/2* e le rimanenti 200 con *Bc-DCL1/2 + Vd-DCL1/2*. Non essendo stato integrato alcun gene reporter nel costrutto genico, l'isolamento dei germogli rigenerati è stato condotto sulla base dell'agente di selezione kanamicina, addizionato al substrato di proliferazione dei germogli (Cappelletti et al., 2015). L'esito dell'applicazione della trasformazione genetica evidenzia che la cv. "Sveva" ha mostrato una maggiore capacità di rigenerazione rispetto alla cultivar "Romina" (Figura 20). Tale evidenza testimonia l'influenza del genotipo sull'efficienza di rigenerazione e trasformazione quandanche le piante attenzionate appartenessero alla stessa specie vegetale (Husaini, 2010). Per giunta, anche l'utilizzo di diversi costrutti genici ha determinato differenti % di efficienza della rigenerazione tra le cultivar (Figura 20). Lo svolgimento di tali prove di trasformazione genetica ha consentito di identificare diverse linee transgeniche putative generate con i due costrutti, per entrambe le cultivar coinvolte (Figura 20). Tali linee transgeniche, in concomitanza alla stesura dello studio, si presentavano in fase di radicazione in vitro.

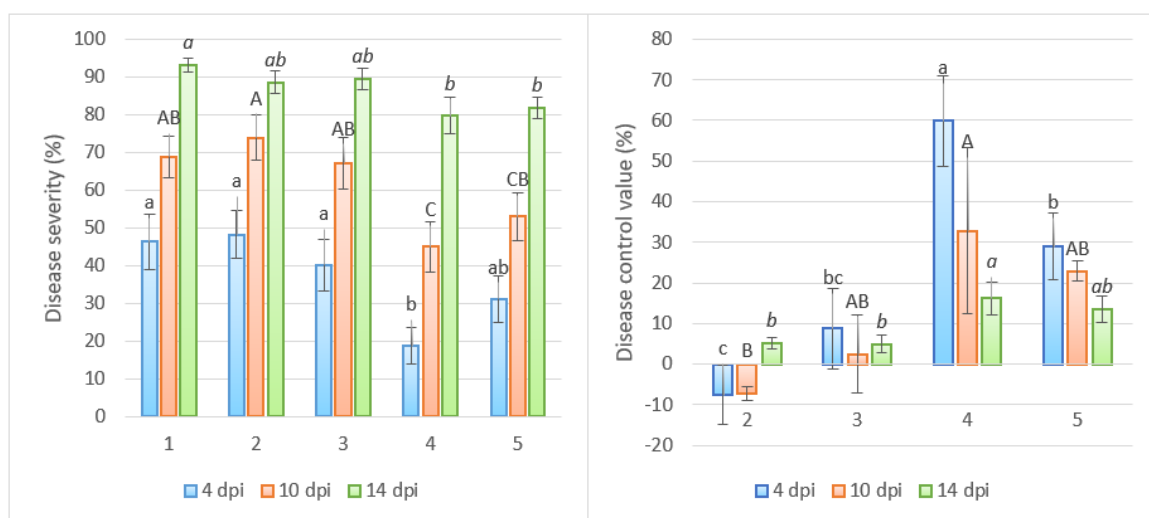
Cultivar	Regeneration efficiency (%)		N. of putative transgenic lines	
	<i>Bc-DCL1/2</i>	<i>Bc-DCL1/2 + Vd-DCL1/2</i>	<i>Bc-DCL1/2</i>	<i>Bc-DCL1/2 + Vd-DCL1/2</i>
Sveva	3.5	6.5	7	13
Romina	2	3	4	6

**Figura 20: Efficienza di rigenerazione (%) e numero di linee transgeniche putative rilevate dopo prove di trasformazione genetica su cultivar "Sveva" e "Romina" con costrutti genici *Bc-DCL1/2* e *Bc-DCL1/2 + Vd-DCL1/2 RNAi* (Sabbadini et al., 2021b).**

Invece, per l'implementazione del metodo SIGS, è stata utilizzata la sequenza genica *Bc-DCL1/2*, la medesima impiegata nelle prove di trasformazione genetica della fragola. Dopodiché, le molecole di dsRNA purificate ottenute sono state conservate a -20 °C, in modo tale da impiegarle nelle prove di applicazione esogena, comprensive di 5 trattamenti: tre a diverse concentrazioni di dsRNA (10, 20, 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) diluito in acqua deionizzata sterile, il controllo negativo (acqua sterile deionizzata) e il controllo positivo (fungicida commerciale).

La validazione preliminare mirava a definire se l'applicazione esogena delle molecole di dsRNA potesse eguagliare o superare l'incisività di un fungicida commerciale convenzionalmente irrorato per il controllo dell'infezione innescata da *B. cinerea*. La misurazione della gravità della patologia % è stata effettuata a 4, 10, 14 giorni successivamente

all'inoculazione solo sui frutti, giacché non sono state osservate lesioni necrotiche sulle foglie di fragola. Di ragguardevole portata sono le evidenze fornite dall'analisi dei dati conseguita nello studio oggetto di trattazione, i quali hanno dimostrato che l'applicazione esogena di dsRNA alla concentrazione più alta ( $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) ha permesso di ridurre l'evoluzione della malattia fungina sui frutti in misura paragonabile all'azione del fungicida commerciale del controllo positivo, ad ogni osservazione eseguita in seguito al trattamento (Figura 21). Nella fattispecie, l'applicazione esogena di dsRNA ( $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) ha palesato una capacità di mitigare l'infezione da *B. cinerea* fino al 60% di riduzione dei sintomi della malattia, a 4 dpi, mentre a 10 e 14 dpi l'efficacia di questo trattamento è diminuita, così come osservato con l'applicazione del fungicida commerciale. Inoltre, è stato ritenuto opportuno - dagli autori - ravvisare l'esigenza di sperimentare nuove formulazioni a base di dsRNA che rendano plausibile l'ampliamento dell'arco di tempo in cui viene garantito un adeguato livello di protezione dal momento che è emersa una notevole variabilità tra gli effetti dei trattamenti basati su dsRNA nudi, verosimilmente dovuta alla degradazione operata dall'RNAsi.



**Figura 21: Gravità della malattia (%) e valore di controllo della malattia (%) della muffa grigia sulle piante di fragola registrati dopo l'applicazione di dsRNA e fungicidi commerciali in serra. 1 = controllo negativo (acqua); 2 = *Bc-DCL1/2* dsRNA  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ; 3 = *Bc-DCL1/2* dsRNA  $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ; 4 = *Bc-DCL1/2* dsRNA  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ ; 5 = controllo positivo (SWITCH,  $0,8 \text{ g } \text{L}^{-1}$ ). Diverse lettere minuscole, maiuscole e minuscole in corsivo mostrano differenze significative tra i diversi trattamenti a 4, 10 e 14 dpi, rispettivamente,**

*per  $p < 0,05$  dal test di Duncan. Ciascun valore rappresenta la media  $\pm$  SE di tre esperimenti indipendenti (Sabbadini et al., 2021b).*

In ultima analisi, dallo studio in questione è stato possibile evincere come gli autori abbiano constatato, in condizioni controllate, un effetto efficace da parte delle molecole di dsRNA indirizzate contro i geni *DCL* della botrite non solo su tessuti distaccati, ma anche su pianta intera, come osservato da Wang et al., (2016b). In aggiunta, una volta che le linee HIGS saranno caratterizzate dalle analisi PCR e sottoposte a inoculazione per testare eventuali resistenze indotte nei confronti di entrambe le patologie (muffa grigia o verticilliosi), tali linee di fragola HIGS potranno rappresentare un modello per la validazione dei costrutti genici *Bc-* e *Vd-DCL1-2*.

Indubbiamente, si rendono necessarie ulteriori prove per confermare l'efficacia e la sostenibilità in condizioni di coltivazione standard delle molecole di dsRNA applicate esogenamente, includendo anche ulteriori studi per giungere all'identificazione di nuovi formulati che stabilizzino le molecole nude del dsRNA.

## CONCLUSIONI

Dai programmi di breeding diffusi su scala globale è possibile registrare un'attività continua di costituzione di nuove cultivar, le quali vengono, in seguito, trasferite nei campi sperimentali delle stazioni di ricerca pubbliche e private al fine di verificarne le potenzialità quali-quantitative. Ciò avviene implementando sistemi di coltivazione locali convenzionali (campo aperto o protetto), a volte combinandoli con una tecnologia fuori suolo avanzata. In sostanza, non si tratta di una casualità se la maggior parte delle cultivar di fragola disponibili sul mercato siano state rilasciate avvalendosi dei tradizionali programmi d'incrocio e selezione. La motivazione alla base della numerosità delle cultivar rilasciate ogni anno dai vari programmi di breeding risiede nella possibilità di adattare le nuove cultivar a diversi ambienti pedoclimatici e quindi di ampliare gli areali di coltivazione, rispondere in modo efficace alle esigenze del produttore in termini di capacità produttiva, resistenza a fattori biotici e abiotici e conservabilità dei frutti, migliorare le caratteristiche qualitative e nutrizionali dei frutti per il consumatore (Mezzetti et al., 2018a).

Tuttavia, nonostante le tecniche di breeding classico abbiano rappresentato – e continuano tuttora a rappresentare - un pilastro essenziale nel miglioramento genetico della fragola, lo sviluppo, l'evoluzione e l'applicazione di innovativi approcci biotecnologici tesi al supporto del breeding in ambito fragolicolo proseguono, compatibilmente alle limitazioni normative vigenti in ogni Stato. Infatti, diversi programmi di ricerca nazionali ed internazionali si stanno impegnando nel supportare economicamente molteplici progetti (ad esempio “RoseBreed” negli Stati Uniti; “Horizon2020-Goodberry”, “iPLANTA” e “MED-Berry” in Europa; “Crea-Biotecnologie” e “PRIN-Micromolecole” in Italia) finalizzati al sostegno dell'applicazione delle biotecnologie genomiche di precisione per il miglioramento genetico della fragola. Inoltre, le conoscenze apportate dagli studi genomici risultano essere cruciali per l'individuazione di nuovi strumenti molecolari per l'analisi e la selezione della diversità genetica, nonché per l'identificazione, protezione commerciale delle cultivar mediante “*fingerprinting*” genetico, individuazione di marcatori molecolari per caratteri di rilievo e, soprattutto, per l'applicazione delle nuove biotecnologie di breeding (NBTs).



Le nuove biotecnologie di breeding (NBTs) offrono nuove soluzioni che potrebbero condurre a notevoli progressi nell'impiego delle tecniche dell'ingegneria genetica e, soprattutto, consentirebbero di superare le difficoltà legate alle onerose procedure di validazione delle piante derivanti da trasformazione genetica e di eludere gli ostacoli posti in essere dall'incertezza normativa e dalla scarsa accettabilità pubblica. Alla luce di queste constatazioni, si ritiene comunque opportuno rimarcare che le tecnologie OGM sono state applicate anche alla fragola coltivata, comprovando la possibilità di utilizzarle per migliorare importanti caratteri della pianta di fragola e la qualità del frutto (Mezzetti, 2009a).

Gli avanzamenti nel campo delle NBTs sono stati resi plausibili dai progressi della biologia molecolare e dalle sensazionali innovazioni strumentali susseguitesesi nell'ultimo ventennio. Tra i più consistenti risultati derivanti dalla ricerca nell'ambito fragolicolo, è indubbiamente fondamentale annoverare il sequenziamento del genoma della fragola diploide selvatica e l'assemblaggio cromosomico quasi completo della fragola ottoploide (Shulaev et al., 2011; Edger et al., 2019), il quale potrebbe rivelarsi particolarmente utile al fine di conseguire risultati di rilievo nel miglioramento genetico della fragola per caratteri come l'estensione del periodo di raccolta, la resistenza a stress biotici, il miglioramento della qualità nutrizionale, il tutto operando per mezzo delle NBTs (ad esempio cisgenesi e intragenesi, *genome editing*, RNAi).

Stante il continuo rilascio di innovazioni in ambito biotecnologico, si reputa comunque necessario puntualizzare le condizioni del quadro regolatorio attuale italiano, il quale, attraverso il combinato disposto dell'interpretazione zelante in Italia della direttiva UE che regola il rilascio degli OGM nell'ambiente con la sentenza della Corte di Giustizia Europea del 25/07/2018, ha sostanzialmente impedito la sperimentazione in campo delle piante ottenute dalle nuove tecnologie di modifica dei genomi.

Questa situazione di stallo regolatorio pare, però, destinata ad evolvere in una direzione ben precisa, col favore della relativa comunità scientifica. Di fatti, la Commissione europea, su richiesta del Consiglio europeo, in data 29/04/2021 ha pubblicato uno studio sullo stato dell'arte delle nuove tecniche genomiche (EUROPEAN COMMISSION, 2021), il quale giunge a delle conclusioni meritevoli di citazione, ovvero che le NBTs possono beneficiare all'agricoltura europea soprattutto ai fini dell'implementazione della strategia From Farm to Fork, possono contribuire a realizzare un sistema agroambientale più sostenibile, presentano rischi simili a quelli dei prodotti dei metodi di breeding classico e che, quindi, risulta necessario adattare il quadro legislativo sugli OGM agli avanzamenti tecnologici e scientifici. Da qui, in ultima analisi, ne discende la volontà da parte della Commissione europea

d'imbastire un'azione strategica sulle piante ottenute mediante *genome editing* (nella versione mutagenesi mirata) e cisgenesi, comprensiva di una valutazione d'impatto e che dovrebbe condurre ad un nuovo impianto regolatorio per le piante risultanti dall'applicazione delle nuove biotecnologie di supporto al breeding.

## BIBLIOGRAFIA

- Aaby, K., Skrede, G., Wrolstad, R.E., 2005. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*). *J Agr Food Chem*, 53, pp. 4032-4040.
- Albani, M. C., Battey, N. H. & Wilkinson, M. J., 2004. The development of ISSR-derived SCAR markers around the *SEASONAL FLOWERING LOCUS (SFL)* in *Fragaria vesca*. *Theor. Appl. Genet.*, 109(3), pp. 571-579.
- Alt-Morbe, J., Kuhlmann, H., Schroder, J., 1989. Differences in induction of Ti-plasmid virulence genes *virG* and *virD* and continued control of *virD* expression by four external factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2, pp. 301–308.
- Antanaviciute, L., Surbanovski, N., Harrison, N. et al., 2015. Mapping QTL associated with *Verticillium dahliae* resistance in the cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Horticulture Research*, 2(1), pp. 1-8.
- Arpaia, S., Christiaens, O., Giddings, K. et al., 2020. Biosafety of GM Crop Plants Expressing dsRNA: Data Requirements and EU Regulatory Considerations. *Frontiers in Plant Science*, 11, 940.
- Baruzzi, G., Ballini, L., Baroni, G. et al., 2017. Updates on Italian strawberry breeding programs coordinated by CREA-FRF. In: *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, pp. 179-184.
- Baruzzi, G., Faedi, W., 2010. Innovazione varietale. In: AA.VV. *La fragola*. Collana Coltura&Cultura. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 316-319.
- Basu, A., Nguyen, A., Betts, N. M. & Lyons T. J., 2014. Strawberry As a Functional Food: An Evidence-Based Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6), pp. 790-806.
- Bertoli, J. D., 2019. The origin and evolution of a favorite fruit. *Nature Genetics*, 51, pp. 372-373.

- Blanco-Ulate, B., Vincenti, E., Cantu, D. and Powell, A.L.T., 2016. Ripening of tomato fruit and susceptibility to *Botrytis cinerea*. In: Fillinger, S. and Elad, Y. (Eds.) *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing, pp. 387–412.
- Borrelli, V. M. G., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A. and Lanubile, A., 2018. The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. *Front. Plant Sci.*, 9, 1245, pp. 1-4.
- Bortesi, L., and Fischer, R., 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), pp. 41-52.
- Brown T, Wareing P. F., 1965. The genetical control of the everbearing habit and three other characters in varieties of *Fragaria vesca*. *Euphytica*, 14, pp. 97–112.
- Bucci, A., Faedi, W., Baruzzi, G., 2010. Origine ed evoluzione. In: AA.VV. *La fragola*. Collana Coltura&Cultura. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 2-11.
- Capocasa, F., Diamanti, J., Tulipani, S., Battino, M. and Mezzetti, B., 2008. Breeding strawberry (*Fragaria* X *ananassa* Duch) to increase fruit nutritional quality. *BioFactors*, 34(1), pp. 67-72.
- Capocasa, F., Scalzo, J., Mezzetti, B. and Battino, M., 2008. Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: the role of genotype. *Food Chemistry*, 111(4), pp. 872-878
- Cappelletti, R., Sabbadini, S., Mezzetti, B., 2015. Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). In: Wang K. *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1224. Springer, New York, NY, pp. 217-226.
- Castro, P., Bushakra, J. M., Stewart, P. et al., 2015. Genetic mapping of day-neutrality in cultivated strawberry. *Mol Breeding*, 35(2), pp. 1-16.
- Cavallini, A., Giordani, T., Natali, L., 2016. Genome editing: il futuro (prossimo) del miglioramento genetico delle piante. Review n. 28 – *Italus Hortus* 23(1), pp. 21.
- Darrow, G. M., 1966. *The Strawberry. History, Breeding and Physiology*. Holt, Rinehart and Winston, NY

- Denoyes, B., Amaya, I., Liston, A., Tennessen, J. et al., 2017. Genomics tools available for unravelling mechanisms underlying agronomical traits in strawberry with more to come. In: *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, pp. 17.
- Diamanti, J., Capocasa, F., Balducci, F., Battino, M., Hancock, J., Mezzetti, B., 2012. Increasing strawberry fruit sensorial and nutritional quality using wild and cultivated germplasm. *PLoS One*, 7, pp. 1-15.
- Diamanti, J., Mazzoni, L., Balducci, F., Cappelletti, R., Capocasa, F. et al, 2014. Use of wild genotypes in breeding program increases strawberry fruit sensorial and nutritional quality. *J. Agric. Food Chem.*, 62, pp. 3944-3952.
- Edger, P. P., Poorten, J. T., VanBuren, R. et al., 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. *Nature Genetics*, 51, pp. 541-542.
- Eikemo, H. and Stensvand, A., 2015. Resistance of strawberry genotypes to leather rot and crownrot caused by *Phytophthora cactorum*. *Eur J Plant Pathol*, 143, pp. 408.
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A.M. and Stewart, A., 2016. Plant Hosts of Botrytis spp. In: Fillinger, S. and Elad, Y. (Eds.). *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, Springer International Publishing, pp. 413–486.
- Espinoza, C., Schlechter, R., Herrera, D. et al., 2013. Cisgenesis and Intragenesis: New tools For Improving Crops. *Biol Res*, 46, pp. 324-325.
- Faedi, W., Casalini, F., Baruzzi, G., 2010. Miglioramento genetico. In: AA.VV. *La fragola*. Collana Coltura&Cultura. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 302-311.
- Feliziani, E. and Romanazzi, G., 2016. Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. *Journal of Berry Research*, 6(1), pp. 47-63.
- Fletcher, S. J., Reeves, P. T., Hoang, B. T. and Mitter, N., 2020. A Perspective on RNAi-Based Biopesticides. *Front. Plant Sci.*, 11, pp. 4.
- Folta, M. K., Barbey, R. C., 2019. The strawberry genome: a complicated past and promising future. *Horticulture Research*, 6(1), pp. 1-3.

- Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S. et al., 2015. The Healthy Effects of Strawberry Polyphenols: Which Strategy behind Antioxidant Capacity? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(sup1), pp. 1-25.
- Gaston, A., Perrotte, J., Lerceteau-Köhler, E. et al., 2013. PFRU, a single dominant locus regulates the balance between sexual and asexual plant reproduction in cultivated strawberry. *Journal of Experimental Botany*, 64(7), pp. 1837-1848.
- Gaston, A., Potier, A., Alonso, M. et al., 2021. FveFT2 florigen/FveTFL1 antiflorigen balance is critical for the control of seasonal flowering in strawberry while FveFT3 modulates axillary meristem fate and yield. *New Phytologist*.
- Gebremichael, D. E., Haile, Z. M., Negrini, F. et al., 2021. RNA Interference Strategies for Future Management of Plant Pathogenic Fungi: Prospects and Challenges. *Plants*, 10, pp. 2-3.
- Gelvin, S. B., 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), pp. 16-37.
- Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M. et al., 2015. Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Function*, 6(5), pp. 1386-1398.
- Giampieri, F., Gasparrini, M., Forbes-Hernandez, T. Y. et al., 2018. Overexpression of the Anthocyanidin Synthase Gene in Strawberry Enhances Antioxidant Capacity and Cytotoxic Effects on Human Hepatic Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*, 66, pp. 581.
- Haile, Z. M., Guzman, N. D., Grace, E., Moretto, M. et al., 2019. Transcriptome profiles of strawberry (*Fragaria vesca*) fruit interacting with *Botrytis cinerea* at different ripening stages. *Frontiers in Plant Science*, 10.
- Halvorsen B., Carlsen M.H., Phillips K.M. et al., 2006. Content of redoxactive compounds (ie, antioxidants) in food consumed in the United States. *Am J Clin Nutr*, 84, pp. 95-135.
- Hancock, J. F., 2020. *Strawberries*. Crop Production Science in Horticulture Series. CAB International, Boston,MA.

- Hardham, A. R., 2001. The cell biology behind Phytophthora pathogenicity. *Austral Plant Pathol.* 30, pp. 91–98.
- Holme, I. B., Wendt, T. and Holm, P. B., 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnology*, 11(4), pp. 395-407.
- Honjo, M., Nunome, T., Kataoka, S. et al., 2015. Simple sequence repeat markers linked to the everbearing flowering gene in long-day and day-neutral cultivars of the octoploid cultivated strawberry *Fragaria x ananassa*. *Euphytica*, 209, pp. 300-301.
- Husaini, A. M., 2010. Pre- and post-agroinfection strategies for efficient leaf disk transformation and regeneration of transgenic strawberry plants. *Plant Cell Rep*, 29(1), pp. 97-110.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A., 1987. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp. 5429-5433.
- Iwata, H., Gaston, A., Remay, A., Thouroude, T., Jeauffre, J., Kawamura, K. et al., 2012. The TFL1 homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant J.*, 69, pp. 118.
- Kandel, R., Bergey, D. R., Dutt, M. et al., 2016. Evaluation of a grapevine-derived reporter gene system for precision breeding of *Vitis*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 124, pp. 599–609.
- Khatodia, S., Bhatotia, K., Passricha, N., Khurana, S. M. P. and Tuteja, N., 2016. The CRISPR/Cas Genome-Editing Tool: Application in Improvement of Crops. *Front. Plant Sci*, 7, pp. 1-10.
- Koskela E. A., Mouhu, K., Albani, M. C., 2012. Mutation in TERMINAL FLOWER1 Reverses the Photoperiodic Requirement for Flowering in the Wild Strawberry *Fragaria vesca*. *Plant Physiology*, 159(3), pp. 1043-1054.
- Koskela, E. A., Sønsteby, A., Flachowsky, H., Heide, O.M. et al., 2016. TERMINAL FLOWER1 is a breeding target for a novel everbearing trait and tailored flowering responses in cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Plant Biotechnol. J.*, 14(9), pp. 1852-1861.

- Kost, T. D., Gessler, C., Jansch, M. et al., 2015. Development of the first cisgenic apple with increased resistance to fire blight. *PLoS ONE*, 10.
- Krens, F. A., Schaart, J. G., Van der Burgh, A. M. et al., 2015. Cisgenic apple trees; development, characterization, and performance. *Frontiers in Plant Science*, 6, 286.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., and Mezzetti, B., 2017. New Biotechnological Tools for the Genetic Improvement of Major Woody Fruit Species. *Front. Plant Sci.*, 8, 1418, pp. 1-11.
- Liu, B., Poulsen, E. G. & Davis, T. M., 2016. Insight into octoploid strawberry (*Fragaria*) subgenome composition revealed by GISH analysis of pentaploid hybrids. *Genome*, 59, pp. 79–86.
- Longhi, S., Giongo, L., Buti, M. et al., 2014. Molecular genetics and genomics of the Rosoideae: state of the art and future perspectives. *Horticulture Research*, 1(1), pp. 1-18.
- Lorenzetti F., Albertini, E., Frusciante, L., Rosellini D., Russi, L., Tuberosa, R., Veronesi F., 2018. *Miglioramento genetico delle piante agrarie*. Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media Srl, Milano, pp. 226-283.
- Lorenzetti, F., Ceccarelli, S., Rosellini, D., Veronesi, F., 2011. *Genetica agraria. Genetica e biotecnologie per l'agricoltura*. Pàtron Editore, Bologna, pp. 287-290.
- Lugaresi, C., Gengotti, S., 2010. Malattie e fisiopatie. In: AA.VV. *La fragola*. Collana Coltura&Cultura. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 228-238.
- Lusk, J.L., Roosen, J., and Bieberstein, A., 2014. Consumer Acceptance of New Food Technologies: Causes and Roots of Controversies. *Annu. Rev. Resour. Econ.*, 6, pp. 381–405.
- Martín-Pizarro, C., Triviño, J. C., and Posé, D., 2019. Functional analysis of the TM6 MADS-box gene in the octoploid strawberry by CRISPR/Cas9-directed mutagenesis. *Journal of Experimental Botany*, 70(3), pp. 885-895.
- Masny, A., Masny, S., Zurawicz, E. et al., 2016. Suitability of certain strawberry genotypes for breeding of new cultivars tolerant to leaf diseases based on their combining ability. *Euphytica*, 210, pp. 342.



- Mazzoni, L., Di Vittori, L., Balducci, F., Forbes-Hernandez, T. Y. et al., 2019a. Sensorial and nutritional quality of inter and intra—Specific strawberry genotypes selected in resilient conditions. *Scientia Horticulturae*, 261, pp. 1-6.
- Mazzoni, L., Giampieri, F., Diamanti, J., Capocasa, F. et al., 2013b. Il profilo nutrizionale della fragola ed il suo impatto sulla salute dell'uomo. Review n. 19 – *Italus Hortus*, 20 (1), pp. 1-9.
- Mazzoni, L., Qaderi, R., Marcellini, M., Mezzetti, B. and Capocasa, F., 2021c. Variation of polyphenol and vitamin C fruit content induced by strawberry breeding. *Acta Hort.*, pp. 1017-1022.
- Mezzetti, B., 2009a. GMO Strawberry: Methods risk and benefits. In: *Genetics and genomics of Rosaceae*, Eds: K.M. Folta and S.E. Gardiner. Springer.
- Mezzetti, B., 2013b. Breeding and biotechnology for improving the nutritional quality of strawberry. *Journal of Berry Research*, 3, pp. 127-129.
- Mezzetti, B., Capocasa, F., 2018. In: Lorenzetti F., Albertini, E., Frusciante, L., Rosellini D., Russi, L., Tuberosa, R., Veronesi F. *Miglioramento genetico delle piante agrarie*. Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media Srl, Milano, pp. 385-387.
- Mezzetti, B., Gentile, A., 2005. Trasformazione genetica delle piante da frutto: risultati, applicazioni e sperimentazione. Review n.2 - *Italus Hortus* 12(4), pp. 84-85.
- Mezzetti, B., Giampieri, F., Zhang, Y. and Zhong, C., 2018a. Status of strawberry breeding programs and cultivation systems in Europe and the rest of the world. *Journal of Berry Research*, pp. 205-218.
- Mezzetti, B., Sabbadini, S., 2019. Biotecnologie di breeding di precisione: analisi delle esperienze in corso. *Frutticoltura*, 5, pp. 24-28.
- Mezzetti, B., Smagghe, G., Arpaia, S. et al., 2020b. RNAi: What is its position in agriculture? *Journal of Pest Science*, 93, pp. 1125-1130.
- Minuto, A., Lazzeri, L., 2010. Fumigazione del suolo. In: AA.VV. *La fragola*. Collana Coltura&Cultura. Bayer CropScience, Ed. Script, Bologna, pp. 254-255.

- Mitter, N., Worrall, E. A., Robinson, K. E. et al., 2017. Clay nanosheets for topical delivery of RNAi for sustained protection against plant viruses. *Nat. Plants*, 3, pp. 1-10.
- Morgante, M., Di Gaspero, G., 2017. In: Galbiati, M., Gentile, A., La Malfa, S., Tonelli, C. *Biotechnologie sostenibili*. Collana Edagricole Università e Formazione. Edagricole – Edizioni Agricole di New Business Media Srl, Milano, pp. 30-33.
- Morrow E. B., Darrow G. M., 1952. Effects of limited inbreeding in strawberries. *Proc Amer Soc Hort Sci.*, 59, pp. 269-276.
- Mouhu, K., Kurokura, T., Koskela, E.A., Albert, V.A., Elomaa, P. and Hytonen, T., 2013. The *Fragaria vesca* homolog of SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS1 represses flowering and promotes vegetative growth. *PlantCell*, 25, 3296–3310.
- Murti, R. H., Kim, H. Y. and Yeoung, Y. R., 2013. Effectiveness of gamma ray irradiation and ethyl methane sulphonate on in vitro mutagenesis of strawberry. *African Journal of Biotechnology*, 12(30), pp. 4803-4804.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q. et al., 2017. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), pp. 275.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T. et al., 2007. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104 (1), pp. 34-41.
- Napoli, C., Lemieux, C., 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, pp. 279–289.
- Nehra, N. S., Chibbar, R. N., Kartha K. K. et al., 1990. Genetic transformation of strawberry by *Agrobacterium tumefaciens* using a leaf disk regeneration system. *Plant Cell Rep.*, 9, pp. 293–8.

- Olbricht, K., Ulrich, D., Weiss, K., Grafe, C., 2011. Variation in the amounts of selected volatiles in a model population of *Fragaria x ananassa* Duch. as influenced by harvest year. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(3), pp. 944-952.
- Palmieri, A., 2020. Fragola: varietà precoci e tardive per restare competitivi. *Informatore Agrario*, 36, pp. 46-49.
- Papadopoulou, N., Devos, Y., Álvarez-Alfageme, F., Lanzoni, A., and Waigmann, E., 2020. Risk assessment considerations for genetically modified RNAi plants: EFSA's activities and perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11, pp. 445.
- Peres, N. A., Timmer, L. W., Adaskaveg, J. E. and Correll, J. C., 2005. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Dis.*, 89, pp. 784–796.
- Pérez-Jiménez, R. M., De Cal, A., Melgarejo, P. et al., 2012. Resistance of several strawberry cultivars against three different pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 10(2), pp. 502-512.
- Petrasch, S., Knapp, S. J., Van Kan, J. A. L. and Blanco-Ulate, B., 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), pp. 877-892.
- Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Pagana, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiswman, S. et al., 2002. The antioxidant activity of regular consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36, pp. 217–233.
- Qin, Y., da Silva, J. A. T., Zhang, L. et al., 2007. Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnology Advances*, 26, pp. 220.
- Rousseau-Gueutin, M. et al., 2009. Tracking the evolutionary history of polyploidy in *Fragaria* L. (strawberry): new insights from phylogenetic analyses of low-copy nuclear genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 51, pp. 515–530.
- Russell, J. P., Wolfe, L. S., Hertz, E. P., Starr, C., McMillan, Beverly., 2016. *Genetica Agraria*. EdiSES Srl, Napoli, pp. 350-354.
- Sabbadini, S., Capocasa, F., Battino, M., Mazzoni, L., and Mezzetti, B., 2021a. Improved nutritional quality in fruit tree species through traditional and biotechnological approaches. *Trends in Food Science & Technology*, pp. 9.

- Sabbadini, S., Capriotti, L., Jin, H. et al., 2021b. RNAi-based approaches to induce resistance against grey mould disease in strawberry. In: *IX International Strawberry Symposium*, 1309, pp. 209-214.
- Sabbadini, S., Capriotti, L., Mezzetti, B., 2020c. Nuovi strumenti biotecnologici per una fragolicoltura sostenibile. *Frutticoltura*, 3, pp. 3-4.
- Sabbadini, S., Gaston, A., Potier, A., Denoyes, B. et al., 2021d. Isolation and phenotypical characterization of the FT-like genes in strawberry (*Fragaria × ananassa*). In: *IX International Strawberry Symposium*, 1309, pp. 217-221.
- Sansavini, S., Dondini, L., 2016. Innovazioni del miglioramento genetico convenzionale e biotecnologico delle piante da frutto. Review n.29 - *Italus Hortus* 23 (2), pp. 55-56.
- Savini, G., Neri, D., Zucconi, F., Sugiyama, N., 2006. Strawberry Growth and Flowering: An Architectural Model. *International Journal of Fruit Science*, 5(1), pp. 29-50.
- Scalzo, J., Politi, A., Pellegrini, N., Mezzetti, B., & Battino, M., 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition*, 21, pp. 207–213.
- Schijlen, E., Ric de Vos, C. H., Jonker, H. et al., 2006. Pathway engineering for healthy phytochemicals leading to the production of novel flavonoids in tomato fruit. *Plant Biotechnol J.*, 4(4), pp. 433-444.
- Schouten, H. J., Krens, F. A. and Jacobsen, E., 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO Reports*, 7(8), pp. 750-753.
- Scott D. H. & Lawrence F. J., 1975. Strawberries. In: Janick, J. *Advance in Fruit Breeding*. Purdue Univ. Pr, pp. 71-80.
- Shulaev, V., Sargent, D., Crowhurst, R. et al., 2011. The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics*, 43(2), pp. 109-114.
- Taning, C. N. T., Arpaia, S., Christiaens, O. et al., 2019. RNA-based biocontrol compounds: current status and perspectives to reach the market. *Pest Management Science*, pp. 841-845.

- Testolin, R., 2012. Biotecnologie di supporto a breeding e propagazione. In: Sansavini S., Costa G., Gucci R., Inglese P., Ramina A., Xiloyannis C. *Arboricoltura generale*. Pàtron Editore, Bologna, pp. 216-227.
- Tulipani, S., Mezzetti, B., Capocasa, F., Bompadre, S., Beekwilder, J., de Vos, C. H. et al., 2008. Antioxidants, phenolic compounds, and nutritional quality of different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 696–704.
- Verma, S., Osorio, L. F., Lee, S., Bassil, N. V., Whitaker, V. M., 2018. Genome-Assisted Breeding in the Octoploid Strawberry. In: Hytonen, T. et al. (Eds.), *The Genomes of Rosaceous Berries and their Wild Relatives. Compendium of Plant Genomes*. Springer International Publishing, pp. 161-171.
- Wagner, N., Mroccka, A., Roberts, P.D. et al., 2011. RNAi trigger fragment truncation attenuates soybean FAD2-1 transcript suppression and yields intermediate oil phenotypes. *Plant Biotechnol. J.*, 9, pp. 723–728.
- Wang, M., Thomas, N. and Jin, H., 2017a. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Current Opinion in Plant Biology*, 38, pp. 133-138.
- Wang, M., Weiberg, A. and Lin, F. M., 2016b. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection. *Nat. Plants*, 2, pp. 1-9.
- Wang, S.Y. and Lewers, K. S., 2007. Antioxidant capacity and flavonoid content in wild strawberries. *Journal of the American Society Horticultural*, 132(5), pp. 629-637.
- Weebadde C. K., Wang D., Finn C. E., 2008. Using a linkage mapping approach to identify QTL for day-neutrality in the octoploid strawberry. *Plant Breeding*, 127, pp. 94–101.
- Whitaker M. V., Knapp J. S., Hardigan A. M., 2020. A roadmap for research in octoploid strawberry. *Horticulture Research*, 7(1), pp. 1-17.
- Whitaker, V. M., Lee, S., L. F., Osorio, L. F. et al., 2017. Advances in strawberry breeding at the University of Florida. In: *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, pp. 1-6.

- Whitehouse, A. B., Simpson, D. W., Johnson, A. W. et al., 2017. Progress in strawberry breeding at NIAB-EMR, East Malling, UK. In: *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, pp. 69-74.
- Zhang, Y., Wang, G., Dong, J. et al., 2017. The current progress in strawberry breeding in China. In: *VIII International Strawberry Symposium*, 1156, pp. 7-12.
- Zischewski, J., Fischer, R., and Bortesi, L., 2017. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology advances*, 35(1), pp. 95-104.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Rambla, J. L., Cabeza, A. et al., 2012. Genetic Analysis of Strawberry Fruit Aroma and Identification of O-Methyltransferase FaOMT as the Locus Controlling Natural Variation in Mesi-furane Content. *Plant Physiology*, 159, pp. 851-870.
- Zotti, M., dos Santos, E. A., Cagliari, D., Christiaens, et al., 2018. RNAi technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. *Pest Manag Sci* 74, pp. 1239-1250.
- <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/201807/cp180111en.pdf>
- <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- [https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/newtechniques-biotechnology/ec-study-new-genomic-techniques\\_en](https://ec.europa.eu/food/plants/genetically-modified-organisms/newtechniques-biotechnology/ec-study-new-genomic-techniques_en)

## RINGRAZIAMENTI

Giunto al termine di questo percorso di laurea triennale, vorrei rivolgere il mio pensiero a coloro che mi hanno affiancato durante il suo compimento. Dapprima ringrazio il mio relatore, Prof. Franco Capocasa, per la disponibilità e cordialità manifestatami nel seguirmi ed assistermi nella fase conclusiva di questo percorso durato tre anni. Di pari rilevanza è stato il contributo del correlatore Dott.ssa Silvia Sabbadini, alla quale indirizzo i miei ringraziamenti per la disponibilità mostrata nei miei confronti e per il supporto tecnico-scientifico nella stesura e attività di correzione della tesi.

A questo punto, non posso non rivolgermi alla mia famiglia, che mi ha inizialmente incoraggiato e poi sostenuto durante questo importante capitolo della mia vita. Un ringraziamento speciale va ai miei genitori, da sempre punto di riferimento della mia vita.

Inoltre, desidero ringraziare i miei compagni di corso, con i quali ho avuto l'opportunità di condividere momenti di entusiasmo e sollievo, ma anche difficoltà e ostacoli caratteristici di ogni percorso di laurea.

Ultimi, ma non per ordine di importanza, gli amici di una vita, ai quali rivolgo i miei ringraziamenti per il sostegno e la pazienza manifestatami nel corso di questi anni.