



Rendiconti  
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL  
*Memorie di Scienze Fisiche e Naturali*  
119° (2001), Vol. XXV, pp. 373-414

SILVIERO SANSAVINI\* – MASSIMO BARBIERI\* – PAOLA NEGRI\*

## **Fatti e prospettive dell'ingegneria genetica per le piante da frutto\*\***

La trasformazione genetica delle piante arboree da frutto, così come è venuta configurandosi in questi ultimi anni, persegue obiettivi assai più circoscritti, ma non necessariamente più facilmente raggiungibili rispetto al «breeding» convenzionale.

Cinque anni fa, chi scrive condusse una prima indagine bibliografica (Singh e Sansavini, 1998) sulla trasformazione delle piante da frutto; ebbene, i lavori scientifici, già allora in numero considerevole, sono cresciuti in misura esponenziale e non si limitano ad approcci metodologici preliminari, essendo ormai in buona parte finalizzati all'inserimento di transgeni d'interesse agronomico e mercantile. Attraverso le segnalazioni della letteratura si contano, nel mondo, almeno una trentina di programmi di trasformazione di specie da frutto che hanno già prodotto alcune migliaia di piante sicuramente transgeniche. Tuttavia, al momento attuale e per la stragrande maggioranza, esse sono prive di interesse commerciale, in quanto portatrici di soli geni reporter e di marcatori per la selezione *in vitro* delle cellule trasformate (per es. resistenza ad antibiotici come la kanamicina).

Nonostante i grandi progressi compiuti, dunque, siamo ancora ben lontani dal conseguimento dei traguardi raggiunti dalla trasformazione di alcune specie erbacee, in particolare dalle cosiddette grandi «commodities» (mais, soia, ecc.), sostenute e controllate, sia nella ricerca che nella brevettazione e nelle vie di diffusione, dalle grandi compagnie multinazionali. Le piante da frutto, generalmente, non interessano le multinazionali del business produttivo e della globalizzazione commerciale (in quanto non fanno abbastanza massa critica) e ciò può spiegare perché nessuna pianta arborea transgenica sia stata finora immessa sul mercato. La sola specie,

\* Dipartimento di Colture Arboree, Università di Bologna, Viale Fanin 46, 40127 Bologna.

\*\* Relazione presentata al Primo Convegno Nazionale della U.N.A.S.A. su «Biotecnologie agroalimentari, industriali, ambientali: problemi e prospettive», Roma, 1-2 ottobre 2001.

non propriamente arborea, trasformata in USA e rivelatasi subito importante per il settore commerciale è la papaya, resa resistente a malattie virali (Manshardt *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 1998); ma rimane un'eccezione, anche perché, a differenza della maggior parte delle specie da frutto (che si propagano agamicamente), essa è propagata per seme, la cui produzione è controllata da grosse società commerciali.

Va inoltre ricordato che gravi ritardi nelle ricerche, almeno in Italia, sono dovuti alle scarse risorse destinatevi e all'arresto dei finanziamenti pubblici, ascrivibile alle scelte politiche degli ultimi 3-4 anni (Sansavini, 1998 e 2000), nonché al conseguente divieto (deciso anche da altri paesi europei) a sperimentare in campo aperto le piante transgeniche. Ciononostante, come già accennato, sono numerose le istituzioni scientifiche anche private (ad es. gruppi di breeders transnazionali), che in Europa e nei Paesi più avanzati, si cimentano in questo campo, con risultati molto promettenti; ma ottenuti finora sul piano unicamente della ricerca e in gran parte ancora da verificare sul piano applicativo. In realtà, tale interesse è più che giustificato, considerando alcuni importanti punti critici del miglioramento genetico convenzionale che hanno creato i presupposti per introdurre l'ingegneria genetica anche nelle specie arboree.

Da indagini condotte qualche anno fa (Laurens, 1997; Sansavini, 1999) presso una cinquantina di Stazioni coinvolte in programmi di miglioramento genetico del melo, fra le priorità degli obiettivi risultò, al primo posto, la resistenza a malattie ed altri stress, insieme all'adattamento ambientale, al miglioramento della qualità e alla capacità di conservazione dei frutti. A tali obiettivi, ancora attuali, non solo per il melo, ma anche per le altre arboree da frutto, seguono, in subordine, la modificazione morfofunzionale dell'albero, per renderlo più efficiente e meglio gestibile (habitus fruttifero compatto o spur, precocità di messa a frutto, costanza di fruttificazione, attitudine all'autocontrollo dell'allegagione). Sono tutti caratteri, questi, controllati da più geni, quasi sempre non ancora noti, che rendono difficile la scelta delle linee parentali nel «breeding» convenzionale, almeno finché non si disporrà di marcatori mappati e relativi QTL.

Inoltre, è noto che l'incrocio (o l'ibridazione interspecifica) e la successiva selezione richiedono, ad ogni generazione di progenie, lunghi tempi di attesa per controllare i caratteri più importanti dell'albero e in particolare la fruttificazione: da un minimo di 6-8 anni nel pesco e nella vite fino a 12-16 anni in specie a più lungo ciclo, come pero e ciliegio. Il lungo periodo di giovanilità, che dilata i tempi richiesti per la selezione, non è però l'unico fattore responsabile degli elevati costi della selezione: occorre disporre, infatti, di popolazioni segreganti particolarmente numerose a causa dell'elevata eterozigosi, prodotta nelle specie allogame (es. pomacee e varie drupacee) da fenomeni di autoincompatibilità gametofitica o sporofitica.

Esemplificativo è il caso del melo: l'introggressione del gene Vf per la resistenza a *Venturia inaequalis* (agente della ticchiolatura), attraverso l'ibridazione interspecifica del *Malus x domestica* con la specie selvatica *Malus floribunda* (portatrice di

detto gene di resistenza), ha richiesto ripetuti reincroci e incroci ricorrenti per un totale di 4-6 generazioni, cioè in pratica oltre 50 anni di processo selettivo (svolto per la maggior parte negli USA): finalmente, anche in Europa, si dispone ora di una rosa di genotipi ticchiolatura-resistenti, licenziati e diffusi commercialmente, alcuni brevettati, che aspirano a competere, anche sul piano qualitativo, con le varietà di melo maggiormente coltivate e apprezzate.

Le difficoltà sopra elencate sono altrettanti motivi che hanno indotto molte delle Stazioni, già impegnate in programmi di «breeding» tradizionale, a intraprendere la strada dell'ingegneria genetica per conseguire gli stessi obiettivi, in tempi meno lunghi e mantenendo intatti, nei genotipi transgenici ottenuti, i superiori caratteri che hanno reso possibile l'affermazione commerciale delle cultivar originarie, acceptrici dei transgeni.

Tenteremo di riassumere in breve i principali problemi di carattere tecnico-biologico che devono essere superati nell'ingegneria genetica applicata alle piante da frutto.

## 1. LE PROBLEMATICHE PIÙ FREQUENTI NELLA TRASFORMAZIONE GENETICA DELLE SPECIE ARBOREE DA FRUTTO

### 1.1. *Metodi di trasferimento genico: diretto o mediato?*

Rispetto alle specie erbacee, non vi sono differenze di rilievo o particolari difficoltà riguardo ai metodi con i quali il trasferimento di geni, inseriti in vettori generalmente plasmidici (Draper e Scott, 1991), può essere effettuato nelle piante arboree. Per queste ultime, che sono per la maggior parte dicotiledoni, c'è, anzi, il vantaggio di poter sfruttare microorganismi selezionati in natura per la capacità di trasferire materiale genetico alle piante con elevata efficienza: *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes*. Per entrambi i batteri, agenti rispettivamente del «tumore del colletto» e della sindrome nota come «hairy roots», la patogenesi è infatti instaurata dall'integrazione ed espressione nel genoma vegetale di una porzione di DNA plasmidico (il T-DNA), recante «oncogeni» per la biosintesi di fitoregolatori.

La transgenosi «mediata» da *Agrobacterium* è quasi sempre preferita al trasferimento «diretto», attraverso le tecniche cosiddette biolistiche, cioè dello «sparo» di materiale genetico opportunamente trattato. Finora si contano alcuni sporadici successi «biolistici» conseguiti su vite (Scorza *et al.*, 1996; Kikkert *et al.*, 1998), banano (Sagi *et al.*, 1995) e papaya (Cabrera Ponce, 1995), non ancora, invece, su pomacee e drupacee. È segnalato anche un altro caso di trasferimento diretto di geni, su arancio (Kobayashi e Uchimiya, 1989) attraverso la metodologia PEG (polietilenglicole).

Riteniamo perciò opportuno tralasciare questi casi sporadici, per concentrare la nostra attenzione sul trasferimento mediato da *Agrobacterium*.

### 1.2. *Trasformazione mediata da Agrobacterium*

Dagli inizi del secolo scorso (Smith e Townsend, 1907) ai giorni nostri, i molti e sempre più approfonditi studi condotti sulle due specie batteriche fitopatogene *A. tumefaciens* e *A. rhizogenes* hanno aperto la strada alla loro utilizzazione biotecnologica, praticata da circa vent'anni e soggetta a continui perfezionamenti. A questo scopo, senz'altro cruciali sono state le ricerche (riassunte da: Hooykaas e Schilperoort, 1992; Zupan e Zambryski, 1995) che hanno portato alla produzione di ceppi disarmati (mediante la rimozione degli oncogeni responsabili della patogenesi) e all'individuazione, nei plasmidi Ti e Ri, delle sequenze di bordo del T-DNA e della regione *vir*, indispensabili per il trasferimento di materiale genetico e funzionali in assetti sia *cis* (realizzati nei vettori cointegrativi) che *trans* (che contraddistinguono i più versatili vettori binari). Ulteriori approfondimenti (Albert *et al.*, 1995; Gheysen *et al.*, 1987; Miranda *et al.*, 1992; Mysore *et al.*, 1998; Rossi *et al.*, 1996; Sundberg *et al.*, 1996; Tinland *et al.*, 1995; Ziemienowicz *et al.*, 2001) hanno portato alla comprensione sempre più dettagliata (ma tuttora incompleta) della dinamica molecolare del trasferimento e dell'integrazione del T-DNA nel genoma vegetale; questi studi hanno avuto ricadute applicative importanti come, ad esempio, la possibilità di mobilizzare anche frammenti di DNA di 100 Kb ed oltre (Hamilton *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999) e l'ampliamento del *range* di specie trasformabili con gli agrobatteri mediante la creazione di ceppi ipervirulenti. Grazie ai progressi fatti in quest'ultimo settore (Ke *et al.*, 2001; Khanna e Raina, 1999), per importanti monocotiledoni da frutto come il banano il trasferimento genico mediato da *Agrobacterium* sp. (May *et al.*, 1995) è destinato a conseguire risultati più produttivi di quello diretto (Sagi *et al.*, l.c.).

Non diversamente da quanto accade in altre specie, comunque, anche per la trasformazione delle arboree risultano utili la pre-induzione degli agrobatteri con sostanze fenoliche per stimolare l'espressione dei geni *vir* (James *et al.*, 1993), il preferenziale impiego di ceppi ipervirulenti (De Bondt *et al.*, 1994; Davidson *et al.*, 1998) e, compatibilmente con l'efficacia del sistema di decontaminazione disponibile, il prolungamento della fase di co-coltivazione (De Bondt *et al.*, l.c.; Cao *et al.*, 1998).

### 1.3. *Efficienza di trasformazione*

Nonostante i vantaggi offerti dalla mediazione degli agrobatteri (di comprovata superiorità rispetto alle tecniche biolistiche o ad altri metodi diretti di trasferimento) nel portare a compimento l'integrazione di materiale genetico (Fisk e Dandekar, 1993; Main *et al.*, 1998; Soloki *et al.*, 1998; Franks *et al.*, 1998), il livello di *efficienza* di trasformazione raggiunto finora con le piante arboree non è sempre soddisfacente, se considerato in termini di numero di piante transgeniche ottenibili in rapporto al numero degli espianti sottoposti a trasformazione e alla mole di lavoro necessaria. Ciò è dovuto al fatto che, nell'intero processo di trasformazione, il

momento più critico si colloca a valle delle fasi compiute dai vettori batterici e consiste nell'acquisizione della capacità morfogenica (*totipotenza*) da parte delle stesse cellule in grado di integrare i transgeni (stato di *competenza alla trasformazione*). La dimostrazione che le suddette due condizioni possono non coincidere sul piano spaziale e/o temporale (Geier e Sangwan, 1996) ha fornito una spiegazione attendibile della scarsa efficienza di trasformazione spesso riscontrata anche in specie facilmente rigenerabili *in vitro*.

Il successo della trasformazione (cioè la pianta transgenica) dipende, dunque, dal verificarsi, contemporaneamente o in successione, dei due stati cellulari di competenza all'integrazione dei transgeni e di totipotenza; sia in ciascuno di essi, che nell'intersezione dei due eventi, possono presentarsi diversi problemi, per la comprensione dei quali sono fondamentali gli studi condotti con l'ausilio di geni «reporter». Utilizzati già da molti anni (Jefferson *et al.*, 1987; Vancanneyt *et al.*, 1990), i marcatori di trasformazione basati sull'attività  $\beta$ -glucuronidasi (GUS) hanno largamente contribuito all'individuazione delle relazioni esistenti fra morfogenesi e trasferimento genico in quanto tale; rispetto ad essi, tuttavia, ancor più dettagliate e preziose informazioni si attendono dai geni «reporter» rilevabili con tecniche di analisi non distruttive, quali la «green fluorescent protein» (GFP), di più recente introduzione, che consente di individuare le cellule transgeniche per semplice eccitazione luminosa agli ultravioletti (Elliott *et al.*, 1999).

Studi effettuati sulle arboree (Maximova *et al.*, 1998; De Bondt *et al.*, l.c., 1996) hanno evidenziato che in queste specie, non diversamente da quanto osservato in diverse piante modello (Janssen e Gardner, 1989), la frequenza di *espressione stabile* dei geni «reporter» (che rispecchia l'efficienza della trasformazione integrativa) è alquanto inferiore rispetto alla frequenza di *espressione transeunte* (riconducibile alla probabile trascrizione dei transgeni ancora al di fuori del nucleo). Il primo dei fattori limitanti l'efficienza di trasformazione è, dunque, per se stessa, la competenza alla stabile integrazione di DNA esogeno, che sembra a sua volta legata alla de-differenziazione e divisione cellulare (Chriqui *et al.*, 1988; Sangwan *et al.*, 1992; Villemont *et al.*, 1997), nonché alla replicazione e/o riparazione dei cromosomi (de Kathen and Jacobsen, 1995; Sonti *et al.*, 1995; Preuss *et al.*, 1999). Infatti, così come in altre specie, nelle arboree la stimolazione della mitosi mediante il ferimento degli espianti (Norelli *et al.*, 1996; Wilson e James, 1998) o l'applicazione di trattamenti ormonali prima o dopo l'inoculazione con agrobatteri (Sriskandarajah e Goodwin, 1998; Cervera *et al.*, 1998) può avere effetti positivi sulla trasformazione integrativa, rilevata come espressione stabile dei geni reporter.

Inoltre, lo stato di competenza sembra dipendere dal tipo di cellula: in specie diverse e, per la maggior parte degli espianti, le cellule trasformabili sono localizzate a livello dei tessuti conduttori e/o nelle zone cambiali (Negri *et al.*, 1997; Maximova *et al.*, l.c.); modificazioni istologiche come quelle indotte dall'eziolamento (Liu *et al.*, 1998) possono aumentare l'efficienza di trasformazione.

Come già detto, però, per ottenere una pianta transgenica il punto più critico non sta tanto nel numero di cellule in grado di integrare stabilmente il T-DNA, quanto piuttosto nel fatto che le stesse devono essere, o diventare, capaci di intraprendere un determinato percorso morfogenico: le vie più dirette sono la *caulogenesi* e l'*embriogenesi somatica*, anche se non mancano casi (es. nel ciliegio) in cui la differenziazione di germogli transgenici è stata preceduta da una fase di rizogenesi, indotta dal plasmide Ri di *Agrobacterium rhizogenes* o da parte di esso (Gutierrez-Pesce *et al.*, 1998; Druart *et al.*, 1998).

Oltre al fatto che la morfogenesi per alcune delle arboree da frutto è per se stessa problematica, deve essere ribadito che, quand'anche si conoscano protocolli di rigenerazione efficienti, è sempre da verificare che questi si prestino al compimento della transgenesi. Innanzitutto, nelle specie arboree, è preferibile escludere i metodi che prevedono l'impiego di espianti prelevati da embrioni zigotici, perché questi, pur dotati di grande capacità morfogenica, non consentono di conservare il genotipo delle cultivar da migliorare mediante inserimento di geni utili. La limitazione all'uso di tessuti somatici maturi è alquanto pregiudizievole, ad esempio, per alcune drupacee (es. albicocco e susino), nelle quali buoni livelli di efficienza di rigenerazione sono stati finora ottenuti soprattutto da embrioni immaturi, utilizzati con successo anche per la trasformazione genetica (da Câmara Machado *et al.*, 1992; Scorza *et al.*, 1994; 1995; Ravelonandro *et al.*, 1995; 1997).

In altri casi, nei quali è stato possibile contare sulla totipotenza di espianti che garantiscono la conservazione del genotipo (foglie, porzioni di fusto, radici, ecc.), si è invece rilevato che alcuni tipi di morfogenesi, anche se facilmente inducibili, non riescono a sfociare nell'ottenimento di piante transgeniche. Le ragioni della mancata corrispondenza fra «efficienza di rigenerazione» ed «efficienza di trasformazione», sono difficilmente generalizzabili, data la forte influenza che il genotipo esercita su entrambe in molte specie da frutto (De Bondt *et al.*, 1996; Puite *et al.*, 1999; McAdam *et al.*, 1998; Pérez-Tornero *et al.*, 2000; Korban *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 2000; Mandegaran *et al.*, 1999); talvolta sono state ricondotte alla presenza di una fase di callogenesi a monte della differenziazione. In alcuni genotipi di melo (Negri, 1999; 2000), pero (Morgues *et al.*, 1996) e agrumi (Ghorbel *et al.*, 1999) è stato infatti notato che la rigenerazione di germogli transgenici ricorre più frequentemente da cellule precedentemente proliferate in forma indifferenziata (organogenesi indiretta), piuttosto che direttamente dall'espianto (organogenesi diretta). Oltre a meglio adattarsi alle esigenze della trasformazione genetica, la rigenerazione indiretta sembra ridurre l'incidenza del chimerismo (Rugini *et al.*, 1996), purché si mantenga un'adeguata pressione selettiva; tuttavia, la fase di proliferazione di callo non dovrebbe prolungarsi troppo, per evitare l'insorgenza di una indesiderata variabilità somaclonale.

In altri casi (Maximova *et al.*, l.c.; da Câmara Machado *et al.*, 1994), la scarsa efficienza di trasformazione è stata attribuita alla possibile inibizione della morfogenesi da parte degli antibiotici o degli altri composti fitotossici impiegati nei

sistemi di selezione «negativa», che sono frequentemente utilizzati nel processo di trasformazione; in base a tale ipotesi, sono stati adottati accorgimenti come il «dilationamento della pressione selettiva», strategia che può sortire esito positivo (Sri-skandarajah e Goodwin, l.c.), pur comportando maggiori problemi di chimerismo (Mathews *et al.*, 1998). Proprio per ridurre l'interferenza del sistema di selezione con i processi di morfogenesi, oltre che per i possibili rischi ecologici connessi all'uso di geni di resistenza come marcatori selezionabili, per il futuro è auspicabile la diffusione dei metodi di selezione «positiva» delle cellule transgeniche (Joersbo e Okkels, 1996; Haldrup *et al.*, 2001), proposti di recente e ancora poco documentati nelle specie arboree.

#### 1.4. *Espressione dei transgeni*

*Promotori* – Una volta individuate le più idonee condizioni sperimentali per ottenere una buona frequenza di rigenerazione delle cellule transgeniche, l'efficacia della trasformazione come metodo di miglioramento genetico resta subordinata alla possibilità di ottenere, nelle piante in campo, un'adeguata espressione del carattere proprio del transgene inserito.

Innanzitutto occorre scegliere un promotore adatto ad una trascrizione costitutiva del transgene o, viceversa, condizionale (subordinata a specifici segnali ambientali, o circoscritta a particolari organi/tessuti, o limitata a determinate fasi dello sviluppo della pianta).

Alcuni promotori eterologhi, inseriti a monte di sequenze codificanti di geni reporter, sono stati sperimentati in specie arboree.

Gittins *et al.* (2000) hanno studiato il livello e la localizzazione dell'espressione del gene GusA, nella trasformazione del melo, usando i promotori dei geni della subunità piccola (SSU) della Rubisco di pomodoro e soia: come altri geni coinvolti nella fotosintesi, sono regolati dalla presenza della luce e, nelle specie di origine, sono trascritti in cotiledoni e foglie, ma non nelle radici. In piante transgeniche di melo, è stato possibile constatare la risposta allo stesso segnale ambientale, in particolare per il promotore SSU di soia, mentre quello di pomodoro, espresso anche nelle radici, si è mostrato meno strettamente legato alla luce. Rispetto all'attività GUS, ottenibile con il promotore CaMV35S, la media delle attività dei promotori SSU è stata valutata circa la metà.

Un altro promotore eterologo sperimentato in melo (Gittins *et al.*, 2001) è il '940 extA' dell'estensina A di *Brassica napus*, gene altamente espresso nei tessuti radicali. Sotto il controllo di tale promotore, il reporter GUS è risultato inaspettatamente espresso in tutti i tessuti delle giovani piante transgeniche di melo, a livelli talvolta superiori a quelli ottenuti con il promotore CaMV35S. Nonostante gli autori non escludano che, rispetto ai pattern di espressione attesi dai promotori eterologhi, le variazioni osservate siano attribuibili all'uso di costrutti incompleti e/o a delezioni del T-DNA, entrambi i lavori citati sono esemplificativi, anche per

una specie arborea, di quanto già osservato in diverse erbacee: cioè del fatto che la scelta di un particolare tipo di promotore può contribuire solo in parte alla determinazione quali-quantitativa dell'espressione dei transgeni. Per una corretta regolazione dei promotori eterologhi, oltre al molto probabile coinvolgimento di fattori attivi in «trans» e non adeguatamente rappresentati nella specie ospite, vi sono altre concause che impediscono il controllo dell'espressione. Infatti, a parte le variazioni genetiche od epigenetiche associate con le colture dei tessuti, gli individui ottenuti da uno stesso genotipo per inserimento del medesimo costrutto variano spesso tra loro nel livello di espressione dei transgeni (Meyer, 1995) in relazione a fattori non ancora controllabili: il numero e la posizione delle copie integrate nel cromosoma, le eventuali delezioni o altri riarrangiamenti del T-DNA, l'attività trascrizionale dei geni vicini (riconducibile alla presenza di promotori/inibitori della trascrizione in prossimità del sito d'inserzione del transgene), il grado di metilazione del DNA, le omologie con geni residenti.

*Soppressione e stabilità dei transgeni* – In generale, è preferibile l'integrazione di una singola copia del transgene; infatti, anche se non è sempre possibile mettere in relazione il livello di espressione con il numero di copie (Draper e Scott, l.c.; Dominguez *et al.*, 2000), nella maggior parte delle specie finora trasformate, anche in quelle arboree (Cervera *et al.*, 2000), è stata più frequentemente riscontrata l'esistenza di una relazione inversa. Come dimostrato in *Populus* (Fladung, 1999), la presenza di ripetizioni invertite può determinare una vera e propria perdita di parte del T-DNA; più spesso, però, senza che si verificino delezioni, la contemporanea presenza di più copie dello stesso transgene, o di più sequenze esogene con elevata omologia fra loro o con geni endogeni, è spesso all'origine del silenziamento delle une e degli altri (co-soppressione), apparentemente attuato a diversi livelli (trascrizionale o post-trascrizionale) e con più meccanismi (Jorgensen, 1992; Flavell, 1994; Matzke *et al.*, 1994; Neuhuber *et al.*, 1994; Schob *et al.*, 1997; Stam *et al.*, 1997; Wassenegger e Pelissier, 1998; Fagard e Vaucheret, 2000), eventualmente implicanti metilazione del DNA (Ingelbrecht *et al.*, 1994; Morel *et al.*, 2000). La metilazione, per se stessa causa di silenziamento genico, in linee transgeniche del portinnesto di melo M7 è stata riconosciuta responsabile della mancata attività del gene reporter GUS, integrato nel genoma (Ko *et al.*, 1998).

Il silenziamento del gene endogeno dovuto ad omologia di sequenza è probabilmente anche responsabile (Waterhouse *et al.*, 1998) del funzionamento della nota strategia di soppressione 'antisense', utilizzata per specie arboree come il melo (Yao *et al.*, 1995; Mehlenbacher, 1995).

Per evitare l'indesiderato fenomeno della co-soppressione, a parte l'utilizzazione di trasposoni come sistemi di trasformazione alternativi per le monocotiledoni (Koprek *et al.*, 2001), è stato più volte proposto, ma non ancora sperimentato su specie arboree, l'uso delle cosiddette 'scaffold attachment regions' (SAR) o 'matrix attachment regions' (MAR) che, affiancando i transgeni di interesse in



adatti costrutti, sembrerebbero proteggerli, una volta integrati nei cromosomi, dai meccanismi di silenziamento attivati dalle omologie di sequenza (Allen *et al.*, 2000; Ulker *et al.*, 1999; Vain *et al.*, 1999).

Sempre riguardo all'espressione dei transgeni, oltre ai suddetti problemi, generalmente rilevabili a breve termine, non meno cruciali sono quelli legati alla stabilità nel tempo dei caratteri conferiti con la trasformazione. Più che la trasmissibilità alle progenie, verificata in melo (James *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1999) e susino (Ravelonandro *et al.*, 2000), per le arboree da frutto e per tutte le specie poliennali è importante studiare le piante transgeniche nel corso di più cicli colturali e in pieno campo, data l'ormai accertata presenza di meccanismi di silenziamento dei transgeni analoghi alla co-soppressione, ma capaci di diffondersi in modo sistemico (Voynet e Baulcombe, 1997; Smyth, 1997; Jorgensen *et al.*, 1998; Fagard *et al.*, 2000) e probabilmente mediati da forme di RNA traslocabili a distanza attraverso il floema. La comprensione di questi fenomeni ha un'importanza che va al di là dell'eventuale dimostrazione o smentita dell'utilità della transgenosi come metodo di miglioramento genetico, poiché interessa anche orizzonti scientifici più ampi (coinvolgenti ad esempio, la fisiologia e la patologia vegetale).

### 1.5. Possibili rischi ambientali

*Dispersione dei transgeni* – A parte le resistenze emotive indotte dai media nell'opinione pubblica, fra i timori più frequentemente espressi, riguardo all'immissione nell'ambiente di piante geneticamente modificate, vi sono quelli motivati dal tipo di marcatori selezionabili utilizzati (più frequentemente geni di resistenza ad antibiotici o a erbicidi). Accanto alla paventata tossicità o allergenicità dei loro prodotti proteici, la preoccupazione più diffusa è che queste sequenze possano trasmettersi ad organismi diversi, anche geneticamente lontani: le coniugazioni batteriche, le infezioni fagiche, la dispersione di polline, sarebbero alcuni dei meccanismi in grado di causarne l'indesiderata diffusione «orizzontale»; ad esempio, ai componenti della microflora intestinale, della rizosfera o della fitosfera (Droge *et al.*, 1998), o a specie vegetali interfertili (Rieger *et al.*, 1999; Metz *et al.*, 1998). Il rilascio nell'ambiente di piante con sequenze che conferiscono potenziali vantaggi adattativi potrebbe perciò costituire un pericolo, ancorché non ci siano prove evidenti.

Riguardo al rischio di selezione di ceppi batterici resistenti ad antibiotici, va comunque ricordato che questi farmaci sono ormai utilizzati da decenni e che, pertanto, la flora batterica dell'uomo e degli animali è comunque sottoposta ad una continua selezione ed evoluzione. L'azione selettiva degli antibiotici somministrati in medicina potrebbe pertanto avere già determinato l'acquisizione delle resistenze ora utilizzate in biologia molecolare da parte di batteri ospiti nel nostro intestino o dell'ambiente. L'entità dei possibili rischi risulta ulteriormente ridimensionata dalla considerazione del fatto che esistono divieti all'utilizzazione degli antibiotici in agricoltura e che, pertanto, in assenza di pressione selettiva nell'ambiente, microorga-

nismi (o piante) accidentalmente modificati nel loro patrimonio genetico per diffusione orizzontale di resistenze ad antibiotici non presenterebbero particolari vantaggi adattativi.

Il rischio di comparsa di infestanti resistenti agli erbicidi, che a differenza degli antibiotici sono diffusamente impiegati in agricoltura, è invece oggetto di discussioni certamente più motivate; il potenziale pericolo, tuttavia, varia ampiamente a seconda della biologia delle specie transgeniche introdotte nell'ambiente.

Per le Rosacee arboree, l'impollinazione mediata dalle api (che presentano il comportamento detto «costanza fiorale») limita, rispetto ad altre specie ad impollinazione anemofila (nocciolo, ulivo), il possibile raggio di dispersione dei transgeni attraverso il polline, pur non eliminando completamente il pericolo della loro trasmissione a specie interfertili.

Un'aggravante del problema della diffusione orizzontale è fornita dall'evidenza che spesso, nelle piante transgeniche, risultano inserite anche sequenze «backbone», cioè regioni plasmidiche esterne al T-DNA dei vettori di trasformazione utilizzati (Kononov *et al.*, 1997).

*Ricerca di vie alternative di sicurezza* – L'accesso dibattito sulla sicurezza dei geni di resistenza come marcatori di trasformazione ha stimolato la ricerca di strategie di selezione alternative, che vale la pena menzionare anche se la loro utilizzazione non è stata ancora riportata per le specie oggetto di questo contributo. Molto promettenti sono quelle (espresse nei punti a, b) che sfruttano l'auxotrofia delle colture vegetali *in vitro*.

a) Il gene *xylA* (di *Streptomyces rubiginosus* e *Thermoanaerobacterium thermo-sulfurogenes*), utilizzato come marcatore in patata, tabacco e pomodoro (Haldrup *et al.*, 1998a, 1998b, 2001), è servito per selezionare cellule trasformate su mezzi di coltura contenenti D-xilosio come unica fonte di carbonio.

b) Ancor più documentato è l'uso del gene *manA* di *Escherichia coli* (Miles e Guest, 1984) codificante per l'enzima fosfomannosio isomerasi (PMI), che permette di selezionare le cellule transgeniche aggiungendo mannosio ai substrati di coltura. Il mannosio non è di per sé nocivo per le cellule vegetali, ma per opera delle esochinasi costitutive viene fosforilato a mannosio-6-fosfato, la cui accumulazione, in assenza di PMI, determina il blocco della glicolisi. In presenza del PMI, invece, il mannosio-6-fosfato viene isomerizzato a fruttosio-6-fosfato, a sua volta catabolizzato attraverso la via glicolitica, conferendo alle cellule trasformate un vantaggio metabolico (Joersbo *et al.*, 1998) rispetto alle altre. Per la tossicità del mannosio-6-fosfato, l'efficacia di questo sistema di selezione, che ha dato buoni risultati su specie erbacee, anche recalcitranti (Joersbo *et al.*, 1998, 1999, 2000; Wang *et al.*, 2000; Negrotto *et al.*, 2000; Reed *et al.*, 2001; Lucca *et al.*, 2001) dipende dall'applicazione di un opportuno gradiente di concentrazione di mannosio, inizialmente associato ad un altro saccaride.

c) Komari *et al.* (1996), invece, suggeriscono l'uso di vettori «super binari», con T-DNA separati, per ottenere piante transgeniche prive di marcatori.

d) Ebinuma *et al.* (2001) propongono l'uso degli oncogeni isopentenil trasferasi (*ipt*) di *A. tumefaciens* e *rol* di *A. rizhogenes* come marcatori morfologici, abbinati ad un sistema di ricombinazione che consente poi di eliminarli dalle piante transgeniche. Particolari assetti molecolari, infatti, possono favorire, nel succedersi dei cicli mitotici, l'autoeliminazione dei marcatori una volta assolto il loro compito.

e) Sono state suggerite (Hanson *et al.*, 1999) anche strategie per la riduzione del rischio di trasferimento di sequenze plasmidiche esterne al T-DNA.

L'obiettivo di eliminare o ridurre la presenza nel prodotto commestibile di qualsiasi proteina di origine transgenica, oltre a quelle codificate dai marcatori, può essere perseguito (quando non vanifichi lo scopo stesso della trasformazione genetica) mediante la scelta di promotori attivi nelle fasi precoci dello sviluppo della pianta e/o dei frutti, o espressi solo in alcune parti non eduli. Nell'ambito della ricerca di promotori alternativi al CaMV35S, sono riportati alcuni contributi in bibliografia (Gittings *et al.*, l.c.).

## 2. TRANSGENI DI INTERESSE AGRONOMICO-COLTURALE

Quali geni sono stati finora oggetto di tecniche di trasformazione del DNA ricombinante, per quali finalità e su quali specie? Si riportano qui alcuni dei risultati più significativi, almeno secondo l'ottica della frutticoltura industriale; abbiamo posto in primo piano le specie vite e melo, che ci paiono quelle maggiormente oggetto di programmi di ricerca già sfociati in risultati molto promettenti e tali da rappresentare, ad oggi, un ampio esempio delle potenzialità applicative della trasformazione genetica delle piante arboree (tabb. 1, 2, 3).

I transgeni finora riportati in letteratura sono per la quasi totalità eterologhi: derivano da batteri o da insetti o da organismi geneticamente piuttosto distanti coi quali, però, condividono, in genere, numerose e ampie regioni conservate, testimonianza, forse, di un lontano percorso filogenetico comune.

### 2.1. Resistenza agli stress abiotici

In questo campo, si ricorda il lavoro di Gao *et al.*, (2001) che hanno inserito in piante di kaki il gene della sorbitolo-6-fosfato deidrogenasi NADP-dipendente, clonato da melo, ottenendo piante che producevano sorbitolo, normalmente non prodotto. Misurando il cambio di attività del fotosistema II, in termini di fluorescenza della clorofilla, hanno osservato una certa tolleranza del sistema fotosintetico allo stress salino, accompagnata da riduzione e alterazione della crescita.

Tab. 1 – Vite: principali trasformazioni con geni funzionali di interesse agrario (1995/2000).

Specie	Varietà	Funzione gene	Transgene	Metodologia ed espianto	Autori
<i>V. vinifera</i>	Superior	Resistenza virus (legno riccio)	MP di GVA	<i>Agrobacterium t.</i> Antere e piccioli	Martinelli <i>et al.</i> , 2001
<i>V. vinifera</i> x Berlandieri	portinnesto 41B	Resistenza virus	CP, polimerasi e proteinasi di GFLV	<i>Agrobacterium t.</i> - Colture cellulari	Mauro <i>et al.</i> , 1998
<i>V. vinifera</i>	Podarok Magaracha	Resistenza erbicida (Basta)	Bar	<i>Agrobacterium t.</i> - foglie	Levenko e Rubtsova, 1998
<i>V. vinifera</i>	Merlot e Chardonnay	Resistenza a botrite e oidio	Endochitinasi (da <i>Trichoderma</i> )	Biolistico	Kikkert <i>et al.</i> , 1998
<i>V. vinifera</i>	Thompson seedless	Resistenza a funghi	Peptide litico	Biol. + <i>Agrobacterium t.</i>	Scorza <i>et al.</i> , 1996
<i>V. vinifera</i>	Thompson seedless	Resistenza a virus	CP di Tom RSU	Biol. + <i>Agrobacterium t.</i>	Scorza <i>et al.</i> , 1996
<i>V. vinifera</i>	Gamay	Aumento etilene	EFE	Elettroporazione Protoplasti	Rombaldi <i>et al.</i> , 1996
<i>V. rupestris</i>	(clone di portinnesto)	Resistenza a funghi	Osmotina	<i>Agrobacterium t.</i> - piccioli e embrioni	Martinelli <i>et al.</i> , 1996
<i>V. vinifera</i>	Riesling e Dornfelder Müller Thurgau	Resistenza a peronospora e oidio	Chitinasi e RIP (proteina inattiv. ribosomi)	<i>Agrobacterium t.</i> - Antere (embrionogenesi)	Harst <i>et al.</i> , 2000

Dati rielaborati e integrati, da Martinelli e Mandolino, 2001.

Tab. 2 – *Principali geni di utilità agronomica inseriti in pomacee.*

<i>Specie e cultivar</i>	<i>Geni esogeni</i>	<i>Autori</i>
Melo	T-DNA di <i>A. rhizogenes</i>	Lambert e Tepfer, 1992
Melo	PPO (polifenolossidasi)	Murata <i>et al.</i> , 2000
Melo M7 (portinnesto)	Attacina E	Norelli <i>et al.</i> , 1993/94; Ko <i>et al.</i> , 1998
Melo «Gala»	<i>Rol B e C</i>	Negri <i>et al.</i> , 1999
Melo «Marshall McIntosh»	Endochitinasi	Bolar <i>et al.</i> , 2000
Melo «Royal Gala»	Attacina E	Aldwinckle <i>et al.</i> , 1999
Melo «Royal Gala»	MB39-cecropina	Liu <i>et al.</i> , 2001
Melo M9 (portinnesto)	<i>Rol B</i>	Zhu <i>et al.</i> , 2001
Melo «Elstar»	S-allele	Van Nerum <i>et al.</i> , 2000
Pero «Beurré Bosc» (= Kaiser)	<i>Rol C</i>	Bell <i>et al.</i> , 1998
Pero «Passa Crassana»	Attacina E	Reynord <i>et al.</i> , 1999
Pero «Bartlett» (= William)	Sam-k (solfoadenosil-metionina)	Bommineni <i>et al.</i> , 2000
Pero «Burakovka»	PD (plant defensin gene)	Lebedev <i>et al.</i> , 2000a
Pero «Burakovka»	Taumatina II	Lebedev <i>et al.</i> , 2000b

## 2.2. Resistenza a stress biotici

Per la resistenza ai *virus* sono state seguite strategie differenti (Martin e Ramsdell, 1995):

- inserimento di geni «CP» («coat protein») per la produzione del capsido virale;
- inserimento di geni per la produzione di forme mutate della replicasi;
- tecnica dell'RNA antisenso;
- alterazione delle proteine per il movimento dei virus tra le cellule e per la diffusione sistemica.

La prima strategia ha raggiunto il maggior numero di applicazioni; diverse evidenze sperimentali, emerse per più specie trasformate con geni CP di virus diversi, concordano nel suggerire che la resistenza delle piante transgeniche non dipenda dall'espressione della proteina capsidica, ma da meccanismi diversi, come di seguito specificato nella trattazione della trasformazione delle drupacee per la resistenza alla sharka.

Nelle arboree, oltre al genere *Prunus*, con geni CP sono state trasformate anche specie diverse del genere *Citrus*. Il gene per il capsido proteico del virus della «tristeza» è stato inserito in arancio amaro (Ghorbel *et al.*, 2000) e limetta messi-

Tab. 3 – *Principali geni di utilità agronomica inseriti in varie specie arboree da frutto.*

<i>Genere / specie</i>	<i>Gene</i>	<i>Autori</i>
Actinidia	Rol A, B, C	Rugini <i>et al.</i> , 1991
Arancio amaro (melangolo)	CP («tristeza»)	Ghorbel <i>et al.</i> , 2000
Caffè	Cry IA	Leroy <i>et al.</i> , 2000
Ciliegio	PhyA-fitocromo	Negri <i>et al.</i> , 1998
Ciliegio «Colt»	T-DNA di <i>A. rhizogenes</i>	Gutiérrez-Pesce <i>et al.</i> , 1998
Limetta	CP («tristeza»)	Dominguez <i>et al.</i> , 2000
Susino	CP-PPV (sharka)	Ravelonandro <i>et al.</i> , 1998
Susino	CP-PPV (sharka)	Callahan <i>et al.</i> , 2001
Kaki	Sorbitolo 6 fosfato – deidrogenasi – NADP dipendente Cry IA (proteina BT)	Gao <i>et al.</i> , 2001 Tao <i>et al.</i> , 1997
Noce	Cry IA (proteina BT)	Dandekar <i>et al.</i> , 2001
Papaya	PRSV replicasi	Chen <i>et al.</i> , 2001

cana (Dominguez *et al.*, l.c). Questi ultimi Autori non hanno individuato alcuna correlazione tra l'espressione del capsido proteico, il numero di copie del gene inserito e il «pattern» di integrazione.

La strategia della replicasi è stata seguita in papaya, per conferire resistenza al PRSV (Chen *et al.*, 2001).

La resistenza agli *insetti* si basa sull'ottenimento di piante che producono inibitori di enzimi essenziali alla vita dell'insetto (es. la proteasi), clonati da patata, *Vigna* sp e cotone, oppure vere e proprie tossine. I geni delle proteine insetticide ICP prodotte da spore di ceppi di *Bacillus thuringiensis*, come le Cry IA (a, b, c), sono stati clonati e trasferiti rendendo le piante tossiche per gli insetti che se ne alimentano, soprattutto lepidotteri. I maggiori risultati sono stati ottenuti, su melo e noce, a Davis (California) da Dandekar *et al.* (1998) e James *et al.* (com. pers.).

La resistenza ai *funghi* potrebbe realizzarsi ingegnerizzando le sequenze che codificano per la chitinasi clonata da *Trichoderma* spp., o per l'osmotina, clonata da tabacco, oppure per la proteina inibitrice della poligalatturonasi (PGIP) trovata, ad esempio, in foglie di melo (Müller e Gessler, 1993; Kollar, 1998). Bolari *et al.* (2000) hanno trasformato la cv Marshall McIntosh di melo con un costrutto contenente il gene dell'endochitinasi di *Trichoderma* spp. Delle otto piante transgeniche ottenute inoculate con *Venturia inaequalis*, sei hanno mostrato una maggior resistenza rispetto al controllo. Un altro progetto di trasformazione del melo sulle cultivar Royal Gala, Golden Delicious, Granny Smith, Pink Lady, è stato sviluppato negli ultimi cinque

anni dall'ARC-Infruitec di Stellenbosch (Sud Africa) utilizzando il transgene PGIP (proteina inibente la poligalatturonasi), che dovrebbe proteggere le piante da numerosi patogeni fungini, quali ticchiolatura da *Venturia inaequalis*, marciume del colletto da *Phytophthora*, marciume radicale da *Rosellinia* ecc. I livelli di espressione della PGIP sulle piante trasformate sono però ancora in via di valutazione. L'endochitinasi ha mostrato, però, anche un effetto negativo sulla crescita delle piante.

Per combattere i batteri patogeni, quali ad esempio *Pseudomonas* spp. e soprattutto *Erwinia amylovora*, sono stati utilizzati i geni di peptidi litici naturali, individuati nell'emolinfina di lepidotteri (cecropina) o nell'endosperma di orzo e frumento (thionina).

Sono stati fatti numerosi esperimenti di trasformazione, anche in melo, per la resistenza al fuoco batterico causato da *Erwinia amylovora* (Norelli *et al.*, 1993, 1994, 1996, 1999; Aldwinckle *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001); in pero, nella cv Passa Crassana è stato inserito il gene dell'attacina E (Reynord *et al.*, 1999): dagli inoculi *in vitro* delle linee transgeniche risultava una riduzione significativa dei sintomi rispetto al controllo.

### 2.3. Resistenza ad erbicidi

Utilizzata anche come «marker» per la selezione di cellule trasformate, la resistenza a erbicidi è estesa a diverse classi di prodotti e deriva da fonti diverse (Draper e Scott, l.c.). Mais e soia transgeniche per la resistenza a glifosate sono ora coltivate con successo in milioni di ettari. A tutt'oggi, fra le specie da frutto solo la papaya è stata trasformata per la resistenza agli erbicidi (Cabrera Ponce *et al.*, l.c.); in futuro, l'inserimento di questo carattere, utile quando gli alberi si trovano in condizione di competere con erbe infestanti in vivaio o in campo, potrebbe interessare anche le altre specie.

### 2.4. Modificazione dell'habitus vegeto-produttivo della pianta

Alcuni dei geni utilizzabili a questo scopo derivano dal T-DNA di agrobatteri. L'alterazione dell'equilibrio ormonale endogeno della pianta è la prima conseguenza dell'infezione da parte del batterio. Per migliorare l'attività rizogena si è studiata l'inserzione, in piante arboree da frutto, degli oncogeni di *A. tumefaciens* e dei geni *rol* derivanti da *A. rhizogenes* (Smigocki e Hammerschlag, 1991; Rugini *et al.*, 1991; Lambert e Tepfer, 1992; Bell *et al.*, 1999; Negri *et al.*, 1999, 2000; Welander e Zhu, 2000; Zhu *et al.*, 2001) (fig. 1).

Per modificare l'habitus delle piante è stata anche considerata la possibilità di sovraesprimere geni di fotorecettori, come il fitocromo A di riso (*phyA*), con il quale sono state prodotte piante transgeniche di ciliegio (Negri *et al.*, 1998).

### 2.5. Sviluppo e maturazione dei frutti

Diversi geni coinvolti in questi processi sono stati utilizzati in studi di trasformazione genetica.

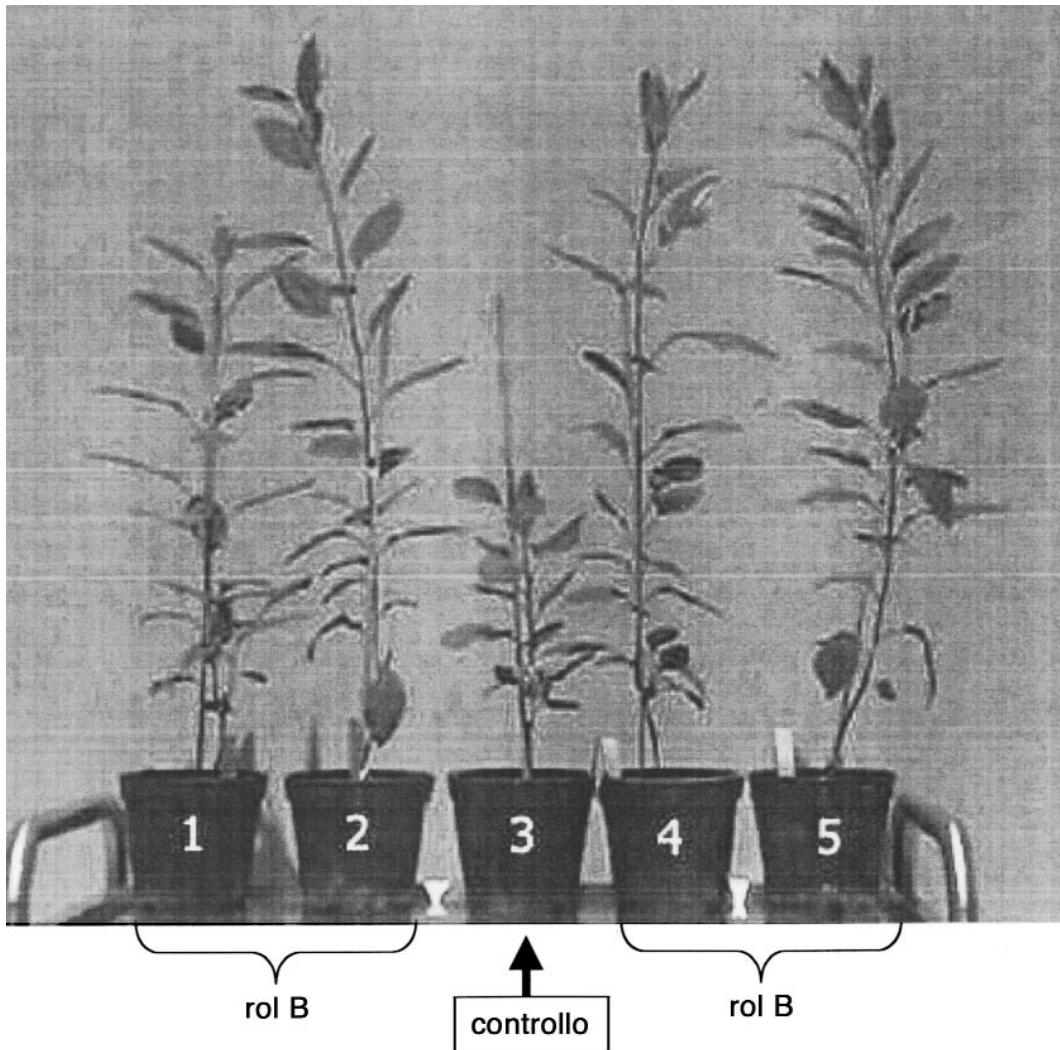


Fig. 1. Rispetto al controllo (trasformato con soli geni marcatori), i cloni transgenici del melo «Gala» ottenuti per inserimento del gene *rol B* mostrano un maggiore sviluppo in altezza. (Centro Sper.le Agrario, Università di Bologna, Cadriano).



a) Per quanto attiene la morfogenesi di frutti partenocarpici, è da segnalare il tentativo italiano in atto di trasformare uve da tavola con semi (es. cv Italia) in uve apirene (B. Mezzetti, com. pers.). Si vorrebbe in tal modo riprodurre il successo ottenuto dal gruppo di ricerca dei proff. Spena-Rotino (collaborazione fra l'Università di Verona e l'Istituto Sperimentale di Orticoltura, Sez. Montanaso Lombardo) nello sviluppo di frutti senza semi di alcune solanacee (melanzana e pomodoro in particolare) con il transgene DefH9-RI-iaaM; questo costrutto si è rivelato capace d'indurre lo sviluppo di frutti partenocarpici di alta qualità grazie a una relativa riduzione del livello di biosintesi dell'auxina IAA (indotta dal transgene), ottenuta per inserimento nel gene originario (DefH9-iaaM) di un introne (RI) del gene *rolA* (Pandolfini *et al.*, 2002; Spena e Rotino, 2001).

b) In merito alla maturazione, l'acquisizione più importante riguarda gli enzimi ACC sintetasi o ACS (clonato in melo, pesco e avocado), e ACC ossidasi o ACO (clonato in pesco e avocado). Questi due enzimi, precursori della via metabolica dell'etilene, sono coinvolti nella maturazione dei frutti climaterici, e nella loro tenuta di maturazione (Castiglione *et al.*, 1996). Bolitho *et al.* (1997) hanno ottenuto piante di pomodoro con l'antisense dell'ACC ossidasi di melo. Così, nei frutti delle piante trasformate, la produzione di etilene è stata ridotta, e si è avuto anche ritardo nello sviluppo del colore.

La stessa strategia è stata applicata anche per specie arboree: da Dandekar e James (com. pers.) sono state ottenute mele «Greensleeves» a ridotta emissione etilenica (antisense), ora in campo per le verifiche al Dipartimento di Pomologia di Davis (Ca), mentre pere Bartlett trasformate col gene Sam-K (da batteriofago) dovrebbero possedere un alterato metabolismo etilenico (Bommineni *et al.*, 2000).

c) Un interessante risultato nella trasformazione di melo è anche quello ottenuto da Murata *et al.* (2000) con un costrutto contenente il gene antisense della polifenolossidasi. Due dei quattro germogli ottenuti hanno mostrato un minor potenziale di imbrunimento rispetto al controllo.

### 3. CASI-STUDIO

#### 3.1. Resistenza a *peronospora* ed *oidio* nella vite

La vite è la specie arborea da frutto nella quale la casistica della trasformazione genetica è stata maggiormente applicata, non solo attraverso *A. tumefaciens*, ma anche per trasferimento diretto, biolistico, come riportato in tab. 1. Gli interventi sono stati fatti sia su *Vitis vinifera*, sia su specie selvatiche e su portinnesti ibridi. La resistenza a stress biotici è il tema ricorrente in quasi tutti i programmi, in particolare a virus e funghi.

Il «case study» qui illustrato riguarda la resistenza a *Plasmopara viticola* (peronospora) e ad *Uncinula necator* (oidio) portata a compimento da un gruppo di ricercatori tedeschi degli istituti di Geilweilerhof e di Wurzburg (LWG).

Occorre premettere che, per tali resistenze, il miglioramento genetico conven-

zionale, pur avendo finora sortito risultati positivi (ad es. le cv Phoenix ad uva bianca e Regent ad uva rossa, consigliate per alcuni areali viticoli tedeschi) è ancora lontano dal poter proporre vitigni atti a sostituire le classiche varietà di *Vitis vinifera* coltivate in Germania ed in Europa, da cui si ottengono i più pregiati vini DOC. Dunque, la trasformazione genetica è stata indicata, anche per la vite, come un potenziale metodo per risolvere il problema della resistenza alle due principali crittogame, salvaguardando i pregi dell'attuale patrimonio varietale.

Occorre premettere che alle tecniche di trasformazione via *Agrobacterium* della vite ha dato un fondamentale contributo Lucia Martinelli, con i suoi preliminari studi sulla rigenerazione ed embriogenesi del gen. *Vitis*. Infatti, nei primi anni '90, Martinelli *et al.* (1993) misero a punto, a San Michele all'Adige, una strategia di embriogenesi somatica a partire da espianti di foglie e piccioli di *V. rupestris*; l'induzione di embriogenesi secondaria a partire da embrioni somatici, nel corso della co-coltivazione con *Agrobacterium* (cfr. fig. 2), fu risolutiva per l'ottenimento di plantule esprimenti stabilmente due geni marcatori, la neomicina fosfotransferasi (NPT II) e la  $\beta$ -glucuronidasi (GUS) (Martinelli e Mandolino, 1994 e 1996). Per queste ricerche la Martinelli ottenne, nel 1994, un prestigioso riconoscimento della Fondazione Rudolf Hermanns all'Università di Geisenheim (Germania).

La base del sistema di trasferimento dei geni è data dalla potenzialità morfogenica degli embrioni (Martinelli *et al.*, 2001) che vengono indotti a svilupparsi ed a maturare, individualmente, in coltura liquida, fase che si è dimostrata cruciale (1997); questa metodologia (Martinelli e Gribaudo, 2001) è risultata valida anche in *V. vinifera* ed è stata utilizzata per il conferimento di altre resistenze nella vite, fra cui quella al legno riccio (Martinelli *et al.*, 2000), mediante l'inserimento dei geni codificanti per la proteina di movimento (MP) dei virus A e B, agenti di tale complesso virale.

Anche i ricercatori tedeschi Harst *et al.* (2000), partendo da colture di antere, hanno utilizzato una tecnica di embriogenesi somatica primaria e poi secondaria, in mezzo sia solido sia liquido (Bornhoff *et al.*, 1998), ottenendo così, in vitigni Riesling, Dornfelder e Müller-Thurgau, un'alta frequenza di rigeneranti, selezionati poi per resistenza a kanamicina.

Per la resistenza a peronospora e oidio sono stati utilizzati: a) il plasmide pGJ40, ingegnerizzato con i geni antimicotici della glucanasi e della chitinasi e, secondariamente, b) il plasmide pGJ42 incorporante i geni della chitinasi e della proteina inattivante il ribosoma (RIP), entrambi sotto controllo del promotore CaMV35S.

La media dell'induzione embriogenica nelle tre cultivar è stata del 14% e quella della conversione degli stessi in plantule radicate dell'8%, con le punte più alte in Riesling. Il confronto fra il mezzo liquido e quello solido è andato a favore del liquido. L'intero processo di trasformazione (compreso l'ambientamento delle piantine ottenute *in vitro*, fino al trasferimento nel suolo esterno) ha richiesto 52 settimane, ma l'intero lavoro è durato, di fatto qualche anno. Secondo i due istituti scientifici tedeschi, che hanno trasformato le viti, è prevedibile che per la verifica

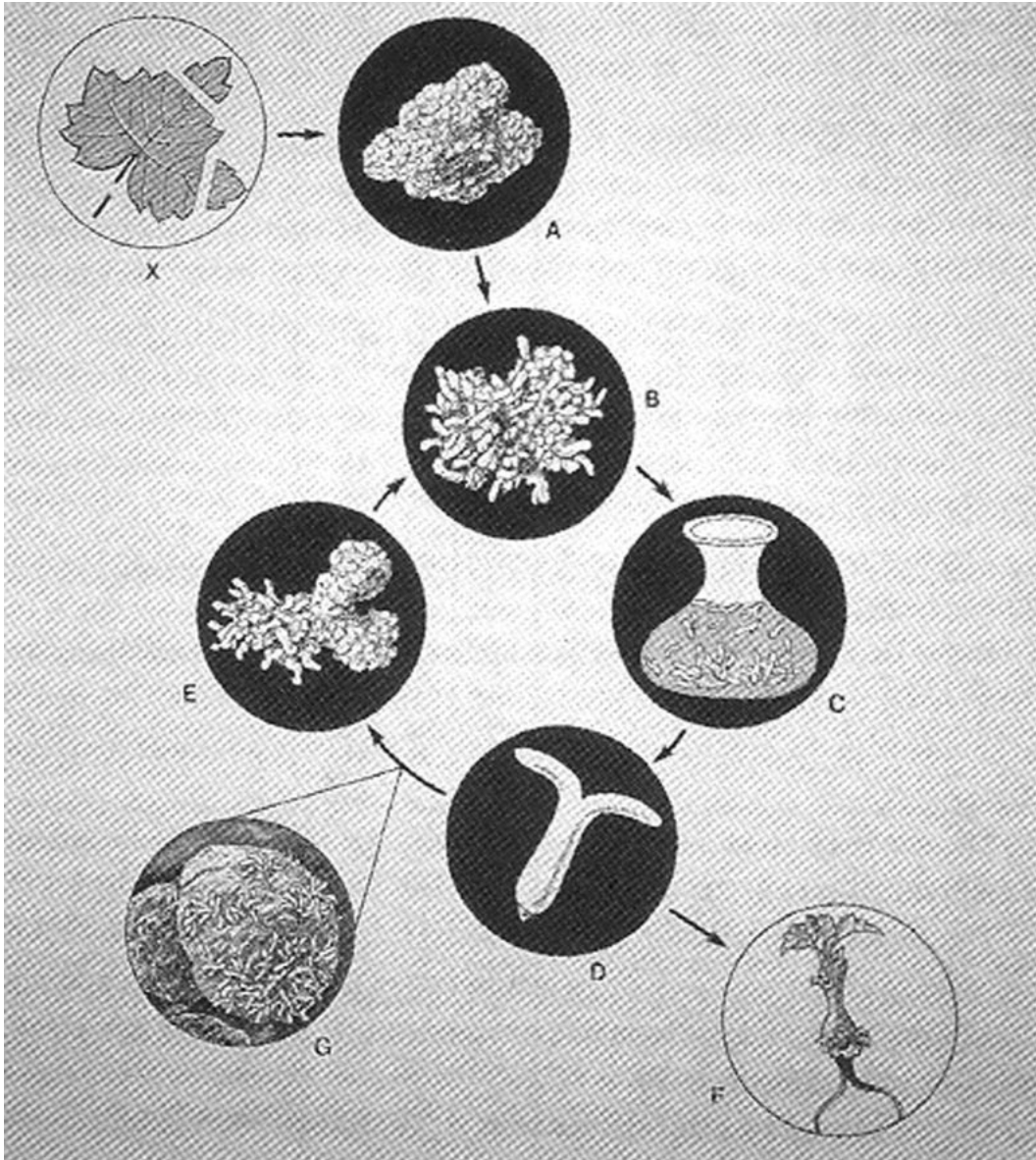


Fig. 2. Fasi della tecnica di rigenerazione-trasformazione messa a punto da L. Martinelli per la vite. La massa di callo (A) derivata dagli espianti fogliari (segmenti di lamina e piccioli) ha generato embrioni (B) fatti maturare in mezzo liquido (C). Gli embrioni isolati (D) possono evolvere, a seconda del mezzo di coltura, in plantule (F) oppure verso la differenziazione di embrioni somatici secondari (E) particolarmente competenti alla trasformazione genetica mediata da *Agrobacterium tumefaciens* (da Martinelli e Mandolino, 2001).

dell'espressione genica e per le prove di resistenza in campo, nonché per il controllo della qualità del vino, si richiederà all'incirca un decennio.

Va infine rilevato che in Australia, Iocco *et al.* (2001), a conclusione di una prova metodologica di trasformazione di numerose varietà di *V. vinifera* fra cui Cabernet Sauvignon, Chardonnay e Riesling, hanno rilevato un'espressione non uniforme nel 35% delle piante trasformate (GUS e GFP come reporter), adombrando la possibilità che vi possa essere stata metilazione di citosina e adenina nei transgeni, oppure un silenziamento genico allo stadio post-trascrizionale.

### 3.2. Resistenza a ticchiolatura nel melo: il gene *Vf*

Nel genoma del melo molti caratteri hanno base poligenica; per alcuni, però, è riportata segregazione monogenica: data l'antica origine della specie, è stata ipotizzata una progressiva divergenza fra cromosomi omologhi e fra geni duplicati, con ripristino funzionale della diploidia (Sanford, 1983). A controllo monogenico sono alcune importanti resistenze a patogeni e fitofagi, come la resistenza a *Venturia inaequalis*, agente della ticchiolatura, per la quale sono stati individuati diversi geni a segregazione indipendente, con rapporto resistenza-suscettibilità 1:1 nelle progenie (Dayton e Williams, 1968; Williams e Kuc, 1969; Lespinasse, 1989; Korban e Chen, 1992).

Il gene *Vf* è quello più studiato nei programmi di miglioramento genetico di numerosi paesi; fu identificato da Hough (1944) che studiò il comportamento della progenie derivante dall'incrocio (*Malus floribunda* 821 x «Rome Beauty») x (*Malus floribunda* 821 x «Rome Beauty»), e ipotizzò che uno dei genitori dell'incrocio avesse ereditato dal *Malus floribunda* 821 un singolo gene dominante per la resistenza a ticchiolatura, gene più tardi chiamato *Vf* (V: *Venturia*, f: *floribunda*). Le selezioni derivanti da questo incrocio hanno costituito le linee parentali per i successivi incroci, dai quali sono derivate la maggior parte delle cultivar resistenti oggi coltivate.

Gli USA sono stati i primi a licenziare una mela resistente alla ticchiolatura: la cv «Prima» (1967); in Germania, però, fin dal 1932 era stato avviato un importante lavoro di miglioramento genetico per la resistenza alla ticchiolatura, per opera di Rudloff e Schmidt, interrotto a causa della guerra. In Europa si è poi lavorato intensamente, specialmente in Francia: nel 1977 fu licenziata la cv «Florina», ad opera dell'INRA di Angers.

Il gene *Vf* è stato finora introdotto in centinaia di selezioni, una cinquantina delle quali sono state licenziate come varietà negli ultimi 3-4 lustri (Sansavini, 1999); nessuna ha però avuto il pieno consenso del mercato.

*Isolamento e clonaggio del gene Vf* – Con la tecnologia degli isoenzimi prima, e dei marcatori del DNA poi, è iniziato il mappaggio del gene *Vf*. Manganaris *et al.* rilevarono, nel 1994, l'associazione tra uno dei sistemi isoenzimatici da loro studiati, la Pgm-1 (fosfoglucomutasi) e la resistenza alla ticchiolatura.

A fine anni '90 numerosi marcatori molecolari sono stati identificati a distanza ravvicinata dal gene, confermandone la presenza come singolo locus. I marcatori RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) più vicini sono stati trovati da Koller (1994) e Tartarini (1996). Gianfranceschi *et al.* (1996) hanno poi trasformato M18 (Koller) in un marcatore CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequence) mappandolo a 1,9 cM da *Vf*. Anche i marcatori RAPD AL07 e AM19 sono stati trasformati (Tartarini *et al.*, 1999) nei più affidabili marcatori SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (fig. 3).

Questi ultimi due marcatori, sul lato opposto del cromosoma rispetto a M18, sono stati la base per il progetto di clonaggio del gene *Vf*, mediante il «map based cloning» (clonaggio dei geni per posizione di mappa), una tecnica che permette di clonare un gene conoscendone solo fenotipo e posizione nella mappa genetica ma non il prodotto genico. Infatti, sulla scia di questo preliminare risultato, il DCA dell'Università di Bologna e l'ETH di Zurigo hanno messo a punto un comune progetto di trasformazione del melo, sviluppato per tappe successive nell'ultimo quadriennio.

Il primo passo verso il clonaggio del gene *Vf* è stata la creazione della libreria BAC (Bacterial Artificial Chromosome) di melo, partendo dal DNA della cv Florina, eterozigote per il gene *Vf* (Vinatzer *et al.*, 1998). Allo stesso tempo, Patocchi *et al.* (1999) avevano determinato che la distanza tra i marcatori fiancheggianti il gene *Vf* era meno di 870 kb. La regione cromosomica corrispondente è poi stata coperta con cloni della libreria BAC identificati mediante la tecnica del «chromosome walking» (Patocchi *et al.*, 1999a, 1999b). Partendo dai cloni BAC con i marcatori più vicini al gene, i cloni che si sovrappongono sono stati identificati procedendo verso il gene. Nella fig. 4 (da Vinatzer, 1999) è rappresentata la mappa fisica della regione *Vf*, ridotta, poi, ad un'estensione di 350 Kb. Sette cloni BAC coprono l'intero «contig». Cinque di questi cloni (62M18, 21F24, 13N14, 29N1, 42M10), sono stati definiti «caldi», poiché da soli coprono tutte le 350 Kb e sono quindi da considerare candidati ad «ospitare» il gene *Vf*.

Nell'ultimo passaggio, è stata costruita una libreria cDNA da foglie della cv Florina elicitate con *Venturia inaequalis*. Lo screening della libreria cDNA con i cloni BAC della regione *Vf* ha portato all'identificazione di 50 geni candidati ad essere il gene *Vf*. Di questi geni, tre mostrano omologie con geni *Cf* di pomodoro per resistenza a *Cladosporium fulvum* (Vinatzer *et al.*, 2001) (fig. 4). Le sequenze complete di questi geni sono state identificate e depositate in «gene bank» (Vinatzer *et al.*, 2001).

*Introgresione del gene Vf* – La prima strada seguita per l'introgresione del gene *Vf* mediante trasformazione genetica (mediata da *A. tumefaciens*) ha utilizzato una porzione di DNA ad alto peso molecolare (oltre le 70 Kb) veicolata da un vettore binario BIBAC (Barbieri, 2000; Barbieri e Vinatzer, 2000). Due cloni BAC dell'area *Vf* sono stati clonati ed utilizzati per la trasformazione del melo (cv Gold Chief, suscettibile a ticchiolatura). Questa esperienza è stata condotta sulla falsariga

### Mappa della regione Vf

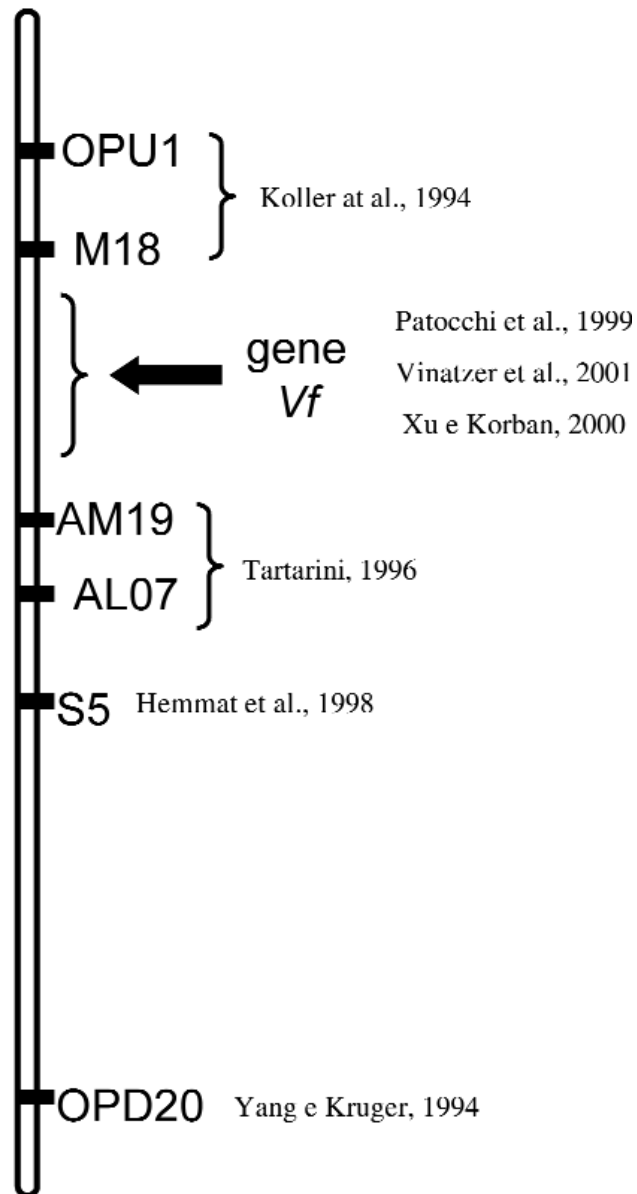


Fig. 3. I marcatori M 18 ed AM 19 strettamente associati alla resistenza a *Venturia inaequalis*, mappano nel «linkage group» del cromosoma n. 1 del melo. Sono stati utilizzati per isolare la regione del gene *Vf* mediante la strategia del «chromosome walking», dopo aver costruito una libreria genomica a largo inserto (BAC o Bacterial Artificial Chromosomes) necessaria per disporre della mappa fisica della regione.

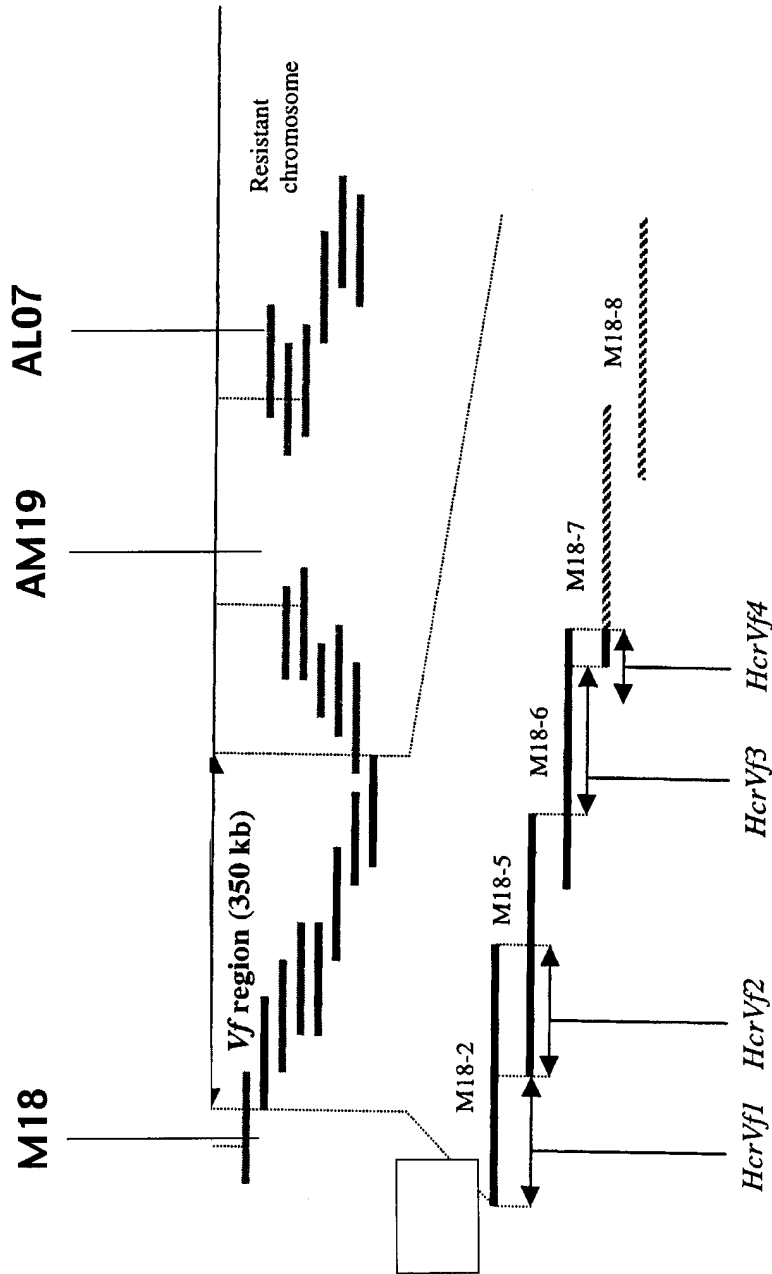


Fig. 4. La regione di genoma dove si colloca il gene *Vf* è di 350,000 paia di basi ed è coperta da soli 5 cloni BAC. In questa regione sono già state identificate diverse sequenze (es. *HcrVf-4*) analoghe al gene *Cf* per la resistenza a *Cladosporium fulvum* di pomodoro. Queste analogie strutturali fanno supporre che il gene *Vf* sia un recettore extracellulare (da Vinatzer *et al.*, 2001).

del precedente lavoro di Hamilton *et al.* (1996 e 1997), che misero a punto un vettore binario per il trasferimento dei cloni BAC con vettori BIBAC 2 di altra natura.

Con la seconda strada, sono stati realizzati costrutti con inserti standard, utilizzando alcune delle sequenze Orf (open reading frame) identificate nella libreria cDNA della cv Florina (fig. 4) ed omologhe ai geni di resistenza a *Cladosporium*, isolati nel pomodoro. Questi costrutti sono stati usati per la trasformazione delle cv di melo, Royal Gala e Golden Delicious, suscettibili alla ticchiolatura.

Da entrambi i percorsi, tra loro complementari (il primo mirante ad introdurre cospicue parti del gene, il secondo ad introdurre la sola sequenza codificante), si sono ottenute piantine transgeniche attualmente sottoposte a specifiche analisi molecolari ed a test di inoculazione artificiale di conidi di *Venturia* per verificare l'espressione del gene *Vf* e dell'intera sequenza introdotta.

### 3.3. La trasformazione delle drupacee per la resistenza a sharka (PPV)

La sharka, causata dal «plum pox virus» (PPV) è attualmente ritenuta la più grave virosi delle drupacee. In Italia, dopo la prima segnalazione in provincia di Bolzano (1973), la malattia si è andata gradualmente diffondendo in tutta la penisola (Faggioli e Barba, 1997) compromettendo gravemente la produzione di impianti di albicocchi, susini e, in tempi più recenti, anche peschi (Poggi Pollini *et al.*, 1996).

Fra gli ospiti naturali del virus, sono presenti anche numerose specie erbacee infestanti. In natura, la diffusione della malattia avviene principalmente attraverso afidi, particolarmente pericolosi nei vivai. Dell'espansione della malattia, in tutto il mondo, sono però responsabili gli scambi e gli innesti di materiale vegetale infetto (Faggioli e Barba, l.c.).

I danni economici possono andare da una leggera diminuzione della produzione a vistose deformazioni che determinano il totale deprezzamento dei frutti, talvolta soggetti anche a cascola.

Probabilmente, a causa della ricombinazione omologa fra RNA virali (Cervera *et al.*, 1993), il PPV è caratterizzato da grande variabilità genetica. In relazione alle caratteristiche sierologiche e molecolari, cui corrispondono anche differenze a livello epidemiologico, i principali isolati del virus sono il ceppo D (Dideron) ed il ceppo M (Marcus), molto più aggressivo del precedente e frequente in Italia.

La serietà del problema del controllo della malattia ha motivato anche interventi legislativi: sono stati emessi decreti di lotta obbligatoria e norme che prevedono l'uso di materiale di propagazione certificato virus-esente.

In diversi paesi, ormai, sono stati da tempo avviati programmi per il miglioramento genetico-sanitario delle drupacee, basati sulla ricerca di fonti di resistenza da utilizzare per incroci controllati, ma non si conoscono per ora risposte adeguate.

Sia nel susino che nell'albicocco sono note alcune potenziali fonti di resistenza o tolleranza. Nel pesco, invece, la scelta appare più problematica.

Per la quantità e la complessità del lavoro preliminare ancora da svolgere, e in considerazione delle difficoltà intrinseche ai tradizionali metodi di incrocio e sele-



zione, la trasformazione genetica è stata accolta come una preziosa alternativa, data l'ormai nota possibilità di ottenere resistenza a virus vegetali mediante il trasferimento di diverse parti del genoma virale. Infatti, diversi ceppi di PPV sono stati completamente sequenziati (Ravelonandro *et al.*, 1990; Maiss *et al.*, 1989; Palkoviks *et al.*, 1993) ed il gene della proteina capsidica (CP) è stato identificato e clonato (Ravelonandro *et al.*, 1992a, 1992b). Dopo una serie di lavori preliminari su *Nicotiana benthamiana* e *N. clevelandii* (piante erbacee ospiti del PPV) per verificare l'efficacia della trasformazione con la proteina capsidica del «plum pox virus» nel conferire resistenza (Laimer *et al.*, 1990; Regner *et al.*, 1992; Ravelonandro *et al.*, 1992b, 1993; da Câmara Machado, 1994), il lavoro è stato esteso alle piante da frutto, in particolare alle specie più sensibili alla malattia virale come il susino (*Prunus domestica*) e l'albicocco (*Prunus armeniaca*).

a) Per quanto riguarda il *susino*, utilizzando vettori con soli geni marcatori, è stata inizialmente attestata la possibilità di trasformare questa specie con *A. tumefaciens*, rigenerandola per caulogenesi da porzioni di ipocotile (Mante *et al.*, 1991). Gli stessi metodi, quindi, sono stati applicati con successo per trasferire anche sequenze di origine virale codificanti per la proteina capsidica (CP) dello stesso PPV (Scorza *et al.*, 1994) o del PRV (maculatura anulare della papaya), un altro «potyvirus» (Scorza *et al.*, 1991). Quest'ultima strategia, tentata per verificare l'eventuale possibilità di ottenere resistenza al PPV mediante l'espressione di una CP eterologa, si è in seguito rivelata solo parzialmente efficace, poiché le piante trasformate con il gene PRV-CP, inoculate con il virus PPV e controllate mediante ELISA e RT-PCR, mostravano un ritardo nella comparsa dei sintomi della sharka, ma non resistenza a lungo termine (Scorza *et al.*, 1995).

Relativamente ai cloni trasformati con il gene per la CP del «plum pox virus», è stato sempre possibile verificare, attraverso PCR, la presenza del transgene nel genoma vegetale, ma il prodotto proteico è stato riscontrato solo in alcuni casi (Scorza *et al.*, 1994). L'effettiva resistenza alla sharka dei cloni PPVCP, inoculati per innesto di gemme infette, è già stata osservata per più cicli vegetativi (Ravelonandro *et al.*, 1998) in base alla presenza dei sintomi e con diversi metodi diagnostici (ELISA, Western blot, RT-PCR). Da questi studi, accompagnati dalla caratterizzazione molecolare delle piante trasformate, è emerso che non vi è correlazione fra resistenza e livello di espressione del gene; al contrario, nel clone più resistente (il «C5»), mentre è stato possibile accertare l'integrazione di copie multiple del transgene, soggette a metilazione, il trascritto (mRNA) è presente a bassi livelli e la proteina capsidica risulta addirittura non rilevabile (Ravelonandro *et al.*, 2000). L'insieme di queste evidenze suggerisce (Ravelonandro *et al.*, 1998; Scorza *et al.*, 2001) che la resistenza ottenuta sia attribuibile a meccanismi di silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS), rilevati anche in piante di *N. benthamiana* trasformate con altri costrutti CP del PPV (Guo *et al.*, 1998, 1999), e per altri virus in vite (Le Gall *et al.*, 1994).

Riguardo alla stabilità del carattere, tuttora in osservazione, un caso di possi-

bile scavalco della resistenza del clone «C5» da parte del PPV è stato segnalato da Malinowski *et al.* (1998).

Anche il possibile impatto a livello ecologico è preso in considerazione dalle attuali ricerche, soprattutto in considerazione dei rischi di complementazione fra i transgeni e gli agenti virali (in particolare i «potyvirus») che possono infettare le piante trasformate in pieno campo (Varrelmann *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 1998b). Per risolvere questo problema, oltre che per il già noto fenomeno dell'eteroincapsidazione, si stanno mettendo a punto speciali costrutti, più sicuri (Varrelmann e Maiss, 2000; Jacquet *et al.*, 1998a).

La strategia attuata per il susino, che prevede l'inserimento del gene per la CP non in cultivar commerciali, ma nei loro semenzali (sono stati infatti trasformati embrioni zigotici), presuppone l'impiego di questi ultimi in incroci controllati e il successivo trasferimento della resistenza per via gamica, possibilità già verificata per questa specie (Ravelonandro *et al.*, 2000).

b) *L'albicocco* è, da tempo, oggetto di programmi di trasformazione genetica per la resistenza alla sharka, mediante trasferimento di sequenze CP del PPV (da Câmara Machado *et al.*, 1992a, 1992b, 1993). La segnalazione delle prime piante transgeniche, rigenerate anche in questo caso da embrioni zigotici inoculati con *Agrobacterium tumefaciens*, risale a dieci anni fa (Laimer da Câmara Machado *et al.*, 1992), ma altri cloni sono stati in seguito ottenuti (Laimer da Câmara Machado, com. pers.), partendo da tessuti maturi (foglie con picciolo) di cultivar commerciali, con un protocollo per l'embriogenesi somatica analogo a quello pubblicato per *Prunus subhirtella autumnosa* (da Câmara Machado *et al.*, 1995).

Per l'inserimento della resistenza nelle migliori cultivar commerciali di albicocco, tuttavia, è ancora necessario molto lavoro, poiché la rigenerazione da tessuti somatici maturi è ancora scarsamente documentata (Pérez-Tornero *et al.*, 2000a, 2000b) e particolarmente problematica. Non sono dunque cadute, in questa specie, le aspettative del breeding convenzionale, pur con tutte le limitazioni del caso; i programmi di miglioramento genetico continuano e anche in Italia è in corso un programma congiunto da parte del D.C.A. dell'Università di Bologna e del DPV dell'Università di Milano, con la collaborazione delle Università di Bari e di Pisa, il cui scopo, oltre al miglioramento della qualità, è anche quello di captare e conferire alle progenie un apprezzabile grado di tolleranza o resistenza a sharka. Sono indicate come resistenti; le cv, Harlayne, Orange Red, Stark Early Orange (Bassi e Andergon, 2002).

#### 3.4. Il «locus S»: superamento della sterilità fattoriale

In numerose specie arboree da frutto, compreso l'olivo, il sistema di sterilità fattoriale, cosiddetto di autoincompatibilità gametofitica è controllato da un singolo locus di sterilità (il «locus S»). I prodotti genici, codificati dagli alleli S finora identificati, sono glicoproteine ad attività ribonucleasica (S-RNasi) espresse nel tessuto trasmettente stilaro (Kao and McCubbin, 1996). In caso di uguale composizione

allelica, tra gametofito maschile e tessuto materno, si ha reazione di incompatibilità con distruzione dell'RNA del tubetto pollinico ad opera delle *S*-RNasi emesse dallo stilo. Appartengono a questo modello di sterilità, melo, pero, ciliegio, susino e, con frequenza limitata, albicocco. Di fatto, la crescita del tubetto pollinico, nel caso sussistano condizioni di identità degli alleli *S* in entrambi i gameti, si arresta, di solito, intorno al terzo superiore dello stilo. La fecondazione, pertanto, non può avvenire, e salvo casi di partenocarpia, il fiore cadrà poco dopo l'antesi.

I numerosi tentativi di superamento di questa forma di sterilità attraverso tecniche particolari, quali «mentor» e «pioneer pollen» (Visser, 1981) e il metodo dello «stilo tagliato», (Van Tuyl *et al.*, 1982) non hanno portato risultati abbastanza soddisfacenti da aver avuto riscontri applicativi diffusi.

In pratica, quindi, per garantire un soddisfacente livello di fruttificazione degli impianti frutticoli, si ricorre ad appropriate consociazioni varietali. Questa apparente soluzione biologica crea però non pochi problemi gestionali dei frutteti a causa delle diverse necessità di intervento delle singole varietà ed anche nei confronti dei frutticoltori sul piano applicativo-organizzativo (ad esempio, per le diversità del piano di protezione sanitaria tra una cultivar e l'altra).

Per tutte queste ragioni, l'ingegneria genetica è vista come uno dei possibili mezzi per risolvere il problema dell'autoincompatibilità. Le tecnologie finora sperimentate sono le seguenti:

- a) utilizzo di radiazioni ionizzanti per l'ottenimento di mutanti autocompatibili;
- b) individuazione di mutazioni spontanee, autocompatibili;
- c) trasferimento genico con costrutti antisense per bloccare l'espressione dell'*S*-RNasi, oppure delezione del locus *S* per variare l'espressione dell'*S*-RNasi.

In breve, lo stato dell'arte di questo settore si può così sintetizzare:

a) Alcuni mutanti autofertili di ciliegio dolce sono stati ottenuti dall'incrocio Emperor Francis (*S3S4*) x polline irradiato di Napoléon (*S3S4'*); in particolare il semenzale autofertile John Innes 2420 (Mattheus, 1971). Quest'ultimo, successivamente, è stato incrociato con Lambert (*S3S4*), dando origine a Stella (*S3S4'*), definita 'la prima cultivar autocompatibile di ciliegio dolce introdotta per piantagioni commerciali' (Lapins, 1971) e tuttora coltivata pure in Italia. Tale cultivar è stata poi utilizzata come genitore di altre varietà selezionate per il carattere autofertilità dallo stesso Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Bologna (es. Sweet Early, Grace Star, Black Star).

b) La varietà di pero giapponese (*P. serotina*) autocompatibile Osa-Nijisseiki deriva da una mutazione spontanea a carico dell'allele *S4* della cultivar autoincompatibile Nijisseiki (*S2S4*). La forma mutata dell'allele, definita *S4sm*, si è mostrata non funzionale nello stilo ma funzionale nel polline probabilmente a causa di una delezione nella regione coinvolta nel determinante stilare (Sassa *et al.*, 1997). In pero europeo (*P. communis* L.) sono state caratterizzate le composizioni alleliche al locus *S* di numerose varietà grazie a metodi biochimici e molecolari (Tassinari *et al.*, 2001).

c) Tra le esperienze condotte utilizzando costrutti antisenso, ricordiamo gli studi su patata – caratterizzata dallo stesso tipo di sterilità – che hanno portato all’ottenimento di piante transgeniche per RNasi *S1* ed *S2*. La riduzione dell’espressione di *S1* ed *S2*, grazie a costrutti antisenso con promotore stilo-specifico di endochitinasi SK2, ha determinato l’annullamento della reazione di autoincompatibilità verso i corrispondenti tubetti pollinici *S1* ed *S2*. (Ficker M. *et al.*, 1998).

Al Dipartimento di Pomologia dell’Università di California-Davis sono state identificate le RNasi stilari associate ad autoincompatibilità gametofitica in melo e mandorlo e clonati i rispettivi cDNA per costruire vettori per l’antisenso (Dandekar, com. pers.).

Risultati apparentemente compiuti, in questa direzione, sono stati ottenuti, sempre in melo, da W. Broothaerts all’Università Cattolica di Lovanio-Belgio (com. pers.). Dalla trasformazione del melo cv Elstar (coppia allelica *S3 S5*) con vari costrutti contenenti sia copie «senso» che «antisenso» del gene *S3*, si sono ottenute alcune piante trasformate che, in auto- ed etero-impollinazioni con polline compatibile, hanno evidenziato comportamenti molto diversi rispetto alle piante di controllo. In particolare, in piante trasformate con porzioni 5’ o 3’ della regione codificante per il gene *S3* si sono evidenziate differenze non significative tra allegazione espressa dalla fertilità seminale (‘seed set’) dopo autoimpollinazione e dopo impollinazione eterogama con polline compatibile. Ciò ha permesso di identificare piante autofertili, di cui però manca ancora un’analisi di espressione dell’S-RNasi (Van Nerum *et al.*, 2000). Successivamente, questi dati sono stati confermati studiando in particolare sei linee transgeniche che hanno evidenziato indici di autofertilità variabili tra 0.16 e 1.05. Ciò indica che attraverso l’ingegneria genetica si possono ottenere livelli diversi di autofertilità, fino ad arrivare all’eliminazione totale del meccanismo dell’autoincompatibilità (Van Nerum, in stampa).

#### 4. CONCLUSIONI

L’evidenza delle problematiche e delle difficoltà che rendono lunghe, complesse e incerte le metodologie di trasformazione genetica nelle specie arboree da frutto, non deve farci sottovalutare la dimensione e la portata dei rilevanti risultati già conseguiti. Nella maggior parte dei casi, le piante transgeniche finora ottenute sono portatrici di geni di resistenze a stress biotici e segnatamente a virus, funghi e batteri. Le metodologie sono diverse e spesso specifiche, come dimostrano i quattro casi-studio esaminati. Una prima grossa limitazione risiede nei processi di rigenerazione ed embriogenesi in presenza di agenti selettivi e nell’efficienza di trasformazione (sempre molto bassa). Ancor più difficile è verificare se i transgeni si esprimono correttamente, e per le funzioni loro proprie, nelle piante trasformate. Occorrerà verificare, nella fattispecie, se le resistenze di campo saranno espresse in misura pari alle aspettative, senza effetti collaterali indesiderati.

Quasi tutti i transgeni di cui si ha notizia in letteratura sono eterologhi (deri-

vano da insetti, batteri, virus, funghi). Pochi sono stati isolati da piante come, ad esempio: il gene della tionina, antibatterico, dall'orzo; i geni di diversi fitocromi, per le modifiche morfogenetiche delle piante, da riso e avena; il gene *Vf* che, essendo stato isolato dal genere *Malus*, rispetto ai geni eterologhi, dovrebbe offrire maggiori garanzie di sicurezza ambientale e biologica, se utilizzato nella trasformazione del melo per conferire resistenza a *Venturia inaequalis*.

In pratica, accettando il «principio di precauzione» introdotto lo scorso anno dall'UE, per le specie arboree le possibilità di diffondere commercialmente le piante trasformate risulterebbero ulteriormente rallentate dalla loro natura poliennale, anche nei casi di maggior successo, per la necessità di controllare l'insorgenza di effetti collaterali nel tempo e nello spazio da parte dei transgeni.

Si prospetta anche la possibilità d'individuare tecniche prive o quasi di rischi, come le «terapie geniche», nei casi conclamati di difetti o suscettibilità a malattie che, all'interno della specie o del genere, abbiano un controllo genico noto. A questo proposito, possono essere ancora di esempio le resistenze a ticchiolatura del melo acquisibili con costrutti che trasferiscono singoli geni di resistenza (es *Vf* e *Va*) provenienti da altri genotipi di melo oppure intere regioni di DNA ove siano individuati i siti di famiglie geniche di resistenza assimilabili, ad esempio, agli RGA di *Cladosporium fulvum* (Cervone e Sansavini, 2000).

Sembra dunque lecito concludere la nostra «review» con una nota di prudente ottimismo. L'ingegneria genetica consente di utilizzare meglio la variabilità genetica esistente in natura, allargando provvidenzialmente le prospettive del «breeding» convenzionale (Gallais, 2000; Salamini, 1999) con rilevanti margini di sicurezza alimentare ed ecologica (Salamini, 1998). Ancorché sia utopistico rincorrere e pretendere l'azzeramento di ogni rischio, è lecito ritenere che, anche per le specie arboree da frutto, lo sviluppo di piante geneticamente modificate non potrà che essere considerato una conquista nell'interesse di tutta l'agricoltura e della società che da questa trae gli alimenti, purché inserito in strategie di miglioramento genetico mirate a risolvere problemi pratici di grande portata, come lo sviluppo di colture a basso impatto ambientale e il miglioramento del benessere e della sicurezza alimentare dei consumatori.

Anche per questo è doveroso concludere con l'auspicio che le autorità italiane tolgano l'ostracismo che da troppo tempo circonda le ricerche nel settore delle biotecnologie e in particolare degli OGM. D'altra parte, sono ormai tante nel mondo le istituzioni pubbliche doppiamente impegnate sul fronte dell'ingegneria genetica e del breeding tradizionale, quasi a dimostrare che i due processi, fra loro integrati, possono e debbono coesistere per le sinergie che riescono a generare.

Gli Autori ringraziano la Dr.ssa Paola Tassinari per la collaborazione alla redazione della scheda «Locus S».

BIBLIOGRAFIA

- Albert H., Dale E.C., Lee E. & Ow D.W. (1995). Site specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *The Plant Journal*, 7 (4): 649-659.
- Aldwinckle H.S., Norelli J.L., Borejsza-Wysocka E. & Reynold J.P. (1999). Field trial of resistance of lytic protein transgenic lines of Royal Gala apple to *Erwinia amylovora* (fire blight). *Abstract 5th Workshop on Integrated Control of pome fruit diseases*. Fontevraud l'Abbaye, 24-27 August 1999, pp. 25.
- Allen G.C., Spiker S., Thompson W.F., Matzke M.A. & Matzke A.J.M. (2000). Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*, special issue: *Plant gene silencing*, 43 (2-3): 361-376.
- Barbieri M. & Vinatzer B. (2000). Subclonaggio di cloni BAC della regione Vf di melo. *Atti V Giornate Scientifiche S.O.I.*, 28-30 marzo 2000, Sirmione (Italia), pp. 361-362.
- Barbieri M., *Trasformazione genetica del melo: subclonaggio di cloni bac della regione Vf*. Tesi Dottorato, 2000.
- Bassi D. & Audergon J.M. (2002). Il miglioramento genetico dell'albicocco: situazione attuale e prospettive. *Riv. Frutticoltura*, 3: 10-21.
- Bell R.L., Scorza R., Srinivasan C. & Webb K. (1999). Transformation of «Beurre Bosc» pear with the rolC gene. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 124 (6): 570-574.
- Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K.W., Hayes C.K., Harman G.E. & Aldwinckle H.S. (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology*, 90 (1): 72-77.
- Bolitho K.M., Lay-Yee M., Knighton M.L. & Ross G.S. (1997). Antisense apple ACC-oxidase RNA reduces ethylene production in transgenic tomato fruit. *Plant Science*, 122 (1): 91-99.
- Bommineni V.R., Mathews H., Clendennen S.K., Samuel S.B., Bristol N., Wagoner W., Jellogg J., Phan C., Schuster D., Kramer M. & Wagner D.R. (2000). Development of an enhanced transformation method in pear (*Pyrus communis* L. cv Bartlett), *Acta Hort.*, ISHS Symp. On Pear Culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Bornhoff B.A., Iannini C., Harst M., Zyprian E. & Töpfer R. (1998). Transformation studies on embryo suspension cultures of *Vitis vinifera* spp. via *Agrobacterium tumefaciens*.
- Cabrera Ponce J.L., Vegas-Garcia A. & Herrera-Estrella L. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell. Rep.*, 15: 1-7.
- Callahan A.M., Scorza R., Vely R., Damsteegt V. & Ravelonandro M. (2001). Resistance of a silenced transgenic plum clone containing the Plum Pox potyvirus coat protein gene. *Ix Int. Conference on the Status of plant, animal and microbe genomes research*. 13-17 January 2001, San Diego (CA), Workshop Abstract 160.
- Cao X., Liu Q., Rowland L.J. & Hammerschlag F.A. (1998). GUS expression in blueberry (*Vaccinium* spp.): factors influencing *Agrobacterium*-mediated gene transfer efficiency. *Plant Cell Reports*, 18: 266-270.
- Castiglione S., Pirola B., Ventura M., Pancaldi M. & Sansavini S. (1996). Forme alleliche degli enzimi ACC ossidasi e ACC sintasi legati a maturazione, ottenute mediante PCR-RFLP in melo. *Atti XL Convegno annuale SIGA*, Perugia, 18-21 settembre 1996, pp. 166-167.
- Cervera M., Pina J.A., Juarez J., Navarro L. & Pena L. (1998). *Agrobacterium*-mediated transformation of citrange: factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Reports*, 18: 271-278.
- Cervera M., Pina J.A., Juarez J., Navarro L. & Pena L. (2000). A broad exploration of a transgenic population of *Citrus*: stability of gene expression and phenotype. *Theor. and Appl. Gen.*, 100 (5): 670-7.

- Cervera M.T., Riechmann J.L., Martian M.T. & Garcia J.A. (1993). 3' terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. *Journal of General Virology*, 74 (3): 329-334.
- Cervone F. & Sansavini S. (1999). Plant resistance mechanisms to diseases: resistance to fungi and bacteria, Accademia dei Lincei, Roma, *Convegno Internazionale Agriculture, Biotechnology And Chemistry: Recent Scientific Contributions to Food and Non-Food Productions*. Roma 30/9 - 1/10/1999.
- Chen G., Ye C.M., Huang J.C., Yu M. & Li B.J. (2001). Cloning of the papaya ringspot virus (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. *Plant Cell Reports*, 20 (3): 272-277.
- Cheng Y.H., Yang J.S. & Yeh S.D. (1996). Efficient transformation of papaya by coat protein gene of papaya ringspot virus mediated by *Agrobacterium* following liquid-phase wounding of embryogenic tissues with carborundum. *Plant Cell Reports*, 16: 127-132.
- Chevreau E. (2000). Pear biotechnology: a review of recent progresses and future breeding applications, *Acta Hort.*, ISHS Symp. On Pear Culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Chriqui D., David C. & Adam S. (1988). Effect of the differentiated or dedifferentiated state of tobacco pith tissue on its behaviour after inoculation with *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 7: 111-114.
- da Câmara Machado M.L., da Câmara Machado A., Mattanovich D., Regner F., Steinkellner H., Hanzer V., Weiss H., Knapp E. & Katinger H. (1992a). Transformation and regeneration of plants of *Prunus armeniaca* with the coat protein gene of plum pox virus. XVth International symposium on virus diseases of temperate fruit crops - XVth International symposium on fruit tree diseases, 8-13 July 1991, Vienna, Austria. *Acta Hort.*, 309: 183-189.
- da Câmara Machado A., Regner F., Steinkellner H., Mattanovich D., Hanzer V., Weiss H., da Câmara Machado M.L. & Katinger H. (1992b). Coat protein-mediated protection against plum pox virus. XVth International symposium on virus diseases of temperate fruit crops - XVth International symposium on fruit tree diseases, 8-13 July 1991, Vienna, Austria. *Acta Hort.*, 309: 203-210.
- da Câmara Machado M.L., da Câmara Machado A., Hanzer V., Weiss H., Regner F., Steinkellner H., Plail R., Knapp E. & Katinger H. (1993). Coat protein-mediated protection against plum pox virus. Second International Symposium on «In vitro culture and horticultural breeding», 28 June-2 July 1992, Baltimore MD, USA. *Acta Hort.*, 336: 85-92.
- da Câmara Machado A., Katinger H. & da Câmara Machado M.L. (1994). Coat protein-mediated protection against Plum Pox Virus in herbaceous model plants and transformation of apricot and plum. *Euphytica*, 7 (1-2): 129-134.
- da Câmara Machado A., Puschmann M., Pühringer H., Kremen R., Katinger H. & Laimer da Câmara Machado M. (1995). Somatic embryogenesis of *Prunus subhirtella autumnosa* and regeneration of transgenic plants after *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 14: 335-340.
- Dandekar A.M., McGranah G.H., Vail P.V., Uratsu S.L., Leslie C.A. & Tebbets J.S. (1998). High-levels of expression of full-length CryIA(c) gene from *Bacillus thuringiensis* in transgenic somatic walnut embryos. *Plant Science*, 131 (2): 181-193.
- Davidson M.D., Chartier-Hollis J.M. & Lynch P.T. (1998). The expression of GUS in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) leaves after co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. In: Davey M.R., Alderson P.G., Lowe K.C., Power J.B. (eds), *Tree biotechnology: towards the millennium*, pp. 321-323.
- Dayton D.F. & Williams E.B. (1968). Independent genes in *Malus* for resistance to *Venturia inaequalis*. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 92: 89-94.
- De Bondt A., Eggermont K., Druart P., De Vil M., Goderis I., Vanderleyden J. & Broekaert W. (1994). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh): an assessment of factors affecting gene transfer efficiency during early transformation steps. *Plant Cell Reports*, 13: 587-593.

- De Bondt A., Eggermont K., Penninckx I., Goderis I. & Broekaert W. (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple (*Malus x domestica* Borkh.): an assessment of factors affecting regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 15: 549-554.
- de Kathen A. & Jacobsen H.J. (1995). Cell competence for *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in *Pisum sativum* L. *Transgenic research*, 4: 184-191.
- Dominguez A., Guerri J., Cambra M., Navarro L., Moreno P. & Pena L. (2000). Efficient production of transgenic Citrus plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports*, 19 (4): 427-33.
- Draper J. & Scott R. (1991). Gene transfer to plants. In: Grierson D., *Plant Genetic Engineering*, pp. 38-81.
- Droge M., Puhler A. & Selbitschka W. (1998). Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *Journal of Biotechnology*, 64 (1): 75-90.
- Druart P., Delporte F., Brazda M., Ugarte-Ballon C., da Câmara Machado A., da Câmara Machado M.L., Jacquemin J. & Ystaas J. (1998). Genetic transformation of cherry trees. *Acta Hort.*, 468: 71-76.
- Ebinuma H. & Komamine A. (2001). MAT (Multi-Auto-Transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37: 103-113.
- Elander M. & Zhu L.H. (2000). The rooting ability of *roB* transformed clones of the apple rootstock M26 and its relation to gene expression. *Acta Hort.*, 521: 133-138.
- Elliott A.R., Campbell J.A., Dugdale B., Brettell R. & Grof C. (1999). Green-fluorescent protein facilitates rapid in vivo detection of genetically transformed plant cells. *Plant Cell Reports*, 18 (9): 707-714.
- Fagard M. & Vaucheret H. (2000). (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 167-194.
- Fagard M., Vaucheret H. & Matzke A.J.M. (2000). Systemic silencing signal(s). *Plant Molecular Biology*. Special issue: *Plant gene silencing*, 43 (2-3): 285-293.
- Faggioli F. & Barba M. (1997). Valutazione del germoplasma di albicocco per la resistenza alla «Vaiolatura delle drupacee» («Sharka»). *Riv. Frutticoltura*, 7/8: 73-75.
- Ficker M., Kirch H.H., Eijlander R., Jacobsen E. & Thompson R.D. (1998). Multiple elements of the 52-RNase promoter from potato (*S. tuberosum* L.) are required for cell type-specific expression in transgenic potato and tobacco. *Mol. Gen. Genet.*, 257: 132-142.
- Fisk H.J. & Dandekar A.M. (1993). The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulturae*, 55: 5-36.
- Fladung M. (1999). Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Molecular and General Genetics*, 260 (8886): 574-581.
- Flavell R.B. (1994). Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific gene duplication. *Proc. Nat. Ac. of Sciences of the USA*, 91 (9): 3490-3496.
- Franks T., He D.G. & Thomas M. (1998). Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants – Genotypic and phenotypic analysis. *Molecular breeding*, 4 (4): 321-333.
- Gallais A. (2002). Evolution des outils de l'amélioration des plantes: de la sélection généalogique à la transgénèse. *Comptes rendus de l'Académie d'agriculture de France*, 86 (4): 13-25.
- Gao M., Tao R., Miura K., Dandekar M.A. & Sugiura A. (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thumb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science*, 160: 837-845.
- Geier T. & Sangwan R.S. (1996). Histology and chimeral segregation reveal cell-specific differences in the competence for shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in *Kohleria* internode explants. *Plant Cell Reports*, 15: 386-390.
- Gheysen G., van Montagu M. & Zambryski P. (1987). Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences. *Proc. Nat. Ac. of Sciences USA*, 84: 6169-6173.



- Ghorbel R., Dominguez A., Navarro L. & Pena L. (2000). High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of *Citrus tristeza virus*. *Tree Physiology*, 20 (17): 1183-89.
- Ghorbel R., Juarez J., Navarro L. & Pena L. (1999). Green fluorescent protein as a screenable marker to increase the efficiency of generating transgenic woody fruit plants. *Theor. and Appl. Genet.*, 99 (1-2), 350-358.
- Gianfranceschi L., Seglias N., Kellerhals M. & Gessler C. (1996). Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 199-204.
- Gittins J.R., Hiles E.R., Pellny T.K., Biricolti S. & James D.J. (2001). The *Brassica napus* extA promoter: a novel alternative promoter to CaMV 35S for directing transgene expression to young stem tissues and load bearing regions of transgenic apple trees (*Malus pumila* Mill.). *Molecular Breeding*, 7 (1): 51-62.
- Gittins J.R., Pellny T.K., Hiles E.R., Rosa C., Biricolti S. & James D.J. (2000). Transgene expression driven by heterologous ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.). *Planta*, 210: 232-240.
- Guo H.S., Cervera M.T. & Garcia J.A. (1998). Plum pox potyvirus resistance associated to transgene silencing that can be stabilized after different number of plant generations. *Gene*, 206 (2): 263-272.
- Guo H.S., Lopez-Moya J.J. & Garcia J.A. (1999). Mitotic stability of infection-induced resistance to plum pox potyvirus associated with transgene silencing and DNA methylation. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12 (2): 103-111.
- Gutiérrez-Pesce P., Taylor K., Muleo R. & Rugini E. (1998). Somatic embryogenesis and shoot regeneration from transgenic roots of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium*X*pseudocerasus*) mediated by pRI 1855 T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Cell Reports*, 17: 574-580.
- Haldrup A., Noerremark M. & Okkels F.T. (2001). Plant selection principle based on xylose isomerase. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 37: 114-119.
- Haldrup A., Petersen S.G. & Okkels F.T. (1998a). Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports*, 18: 76-81.
- Haldrup A., Petersen S.G. & Okkels F.T. (1998b). The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent. *Plant Molecular Biology*, 37: 287-296.
- Hamilton C.M. (1997). A Binary-BAC system for plant transformation with high molecular weight DNA. *Gene*, 200: 107-116.
- Hamilton C.M., Fray A., Lewis C. & Tanksley S.D. (1996). Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 9975-9979.
- Hanson B., Engler D., Moy Y., Newman B., Ralston E. & Gutterson N. (1999). Technical advance: A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J.*, 19 (6): 727-734.
- Harts-Langenbucher M. & Alleweldt G. (1993). The effect of different pre-treatments on induction of somatic embryogenesis on anthers of grapevine cv Riesling. *Vitis*, 32: 1-7.
- Harst M., Bornhoff A., Zyprian E., Töpfer R. & Jach G. (2000). Regeneration and transformation of different explants of *Vitis vinifera* spp. *Acta Hort.*, 528: 321-327.
- Harst M., Bornhoff B.A., Zyprian E. & Topfer R. (2000). Influence of culture technique and genotype on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of somatic embryos (*Vitis vinifera*) and their conversion to transgenic plants, *Vitis*, 39 (3): 99-102.
- Hemmat M., Weeden N.F., Aldwinckle H.S. & Brown S.K. (1998). Molecular markers for the scab resistance (*Vf*) region in apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 123: 992-996.
- Hooykaas P.J.J. & Schilperoort R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology*, 19: 15-38.

- Hough L.F. (1944). A survey of the scab resistance of the foliage on seedlings in selected apple progenies. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 44: 260-272.
- Ingelbrecht I., van Houdt H., van Montagu M. & Depicker A. (1994). Post-transcriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation. *Proc. Nat. Ac. of Sciences of the USA*, 91 (22): 10502-10506.
- Jacquet C., Delecote B., Raccach B., Lecoq H., Dunez J. & Ravelonandro M. (1998a). Use of modified plum pox virus coat protein genes developed to limit heteroencapsidation-associated risks in transgenic plants. *J. of Gen. Virology*, 79 (6): 1509-1517.
- Jacquet C., Ravelonandro M. & Dunez J. (1998b). High resistance and control of biological risks in transgenic plants expressing modified plum pox virus coat protein. *Acta Virol.*, 42 (4): 235-237.
- James D.J., Passey A.J. & Baker S.A. (1995). Transgenic apples display stable gene expression in the fruit and mendelian segregation of the transgenes in the R1 progeny. *Euphytica*, 85: 109-112.
- James D.J., Uratsu S., Cheng J., Negri P., Viss P. & Dandekar A.M. (1993). Acetosyringone and osmoprotectants like betaine or proline synergistically enhance *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Plant Cell Reports*, 12: 559-563.
- Janssen B.J. & Gardner R.C. (1989). Localized and transient expression of GUS in leaf discs following cocultivation with *Agrobacterium*. *Plant Molecular Biology*, 14: 61-72.
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal* 6 (13): 3901-3907.
- Jocco P., Franks T. & Thomas M.R. (2001). Genetic transformation of major wine grape cultivars of *Vitis vinifera* L. *Transgenic Res.*, 10: 105-112.
- Joersbo M. & Okkels F.T. (1996). A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. *Plant Cell Reports*, 16: 219-221.
- Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S.G., Brunstedt J. & Okkels F.T. (1998). Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Molecular breeding*, 4: 111-117.
- Joersbo M., Mikkelsen J.D. & Brunstedt J. (2000). Relationship between promoter strength and transformation frequencies using mannose selection for the production of transgenic sugar beet. *Molecular breeding*, 6: 207-213.
- Joersbo M., Petersen S.G. & Okkels F.T. (1999). Parameters interacting with mannose selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiologia Plantarum*, 105: 109-11.
- Jorgensen R. (1992). Silencing of plant genes by homologous transgenes. *Agrobiotech News and Information*, 4 (9): 265N-273N.
- Jorgensen R.A., Atkinson R.G., Forster R.L.S. & Lucas W.J. (1998). An RNA-based information superhighway in plants. *Science-Washington*, 279 (5356): 1486-1487.
- Kabayashi S. & Uichimia (1989). Expression and integration of a foreign gene in orange (*Citrus sinensis*) protoplast by direct DNA transfer. *Japan J. Genet.*, 64: 91-97.
- Kao & Mc Cubbin A. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. USA.*, 93: 12059-12065.
- Ke J., Khan R., Johnson T., Somers D.A. & Das A. (2001). High-efficiency gene transfer to recalcitrant plants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 20: 150-156.
- Khanna H.K. & Raina S.K. (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice cultivars using binary and superbinary vectors. *Australian J. Plant Phys.*, 26 (4): 311-324.
- Kikkert J.R., Reustle G.M., Ali G.S., Wallace P.W. & Reisch B.I. (1998). Expression of a fungal chitinase in *Vitis vinifera* L. «Merlot» and «Chardonnay» plants produced by biolistic transformation. *Proc. VIIIth Int. Symp. on grapevine genetics and breeding*, Montpellier, France, Jul. 6-10, 1998.
- Ko K., Brown S.K., Norelli J.L. & Aldwinckle H.S. (1998). Alterations in NPTII and GUS expression following micropropagation of transgenic M7 apple rootstock lines. *J. Am. Soc. Horticl. Sci.*, 123 (1): 11-18.

- Kollar A. (1998). Characterization of an endopolygalacturonase produced by the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*. *Mycological research*, 102: 313-319.
- Koller B., Gianfranceschi L., Seglias N., McDermott J. & Gessler C. (1994). DNA-markers linked to the *Malus floribunda* 821 scab resistance. *Plant. Mol. Biol.*, 26: 597-602.
- Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N. & Kumashiro T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal*, 10 (1): 165-174.
- Kononov M.E., Bassuner B. & Gelvin S.B. (1997). Integration of T-DNA binary vector «backbone» sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant Journal*, 11 (5): 945-957.
- Koprek T., Rangel S., McElroy D., Louwerse J.D., Williams-Carrier R.E. & Lemaux P.G. (2001). Transposon-mediated single-copy gene delivery leads to increased transgene expression stability in barley. *Plant Physiology*, 125 (3): 1354-1362.
- Korban S.S. & Chen H. (1992). Apple. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. Ed. F.A. Hammerschlag & R.E. Litz, C.A.B. International, pp. 203-227.
- Laimer da Câmara Machado M., da Câmara Machado A., Hanzer V., Weiss H., Regner F., Steinkellner H., Mattanovich D., Plail R., Knapp E., Kalthoff B. & Katinger H. (1992). Regeneration of transgenic plants of *Prunus armeniaca* containing the coat protein gene of Plum Pox Virus. *Plant Cell Reports*, 11 (1): 25-29.
- Laimer M., da Câmara Machado A., Mattanovich D., Regner F., Hanzer V., Steinkellner H., Durniok B., Himmler G. & Katinger H. (1990). Expression of the plum pox virus coat protein gene in *Nicotiana clevelandii*. *Acta Hort.*, 280: 85-92.
- Lambert C. & Tepfer D. (1992). Use of *Agrobacterium rhizogenes* to create transgenic apple trees having an altered organogenic response to hormones. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 105-109.
- Lapins K.O. (1971). Stella, a self-fruitful sweet cherry. *Can. Journ. Pl. Sci.*, 51.
- Lebedev V.G., Lavrova N., Lunin V.G. & Dolgov S.V. (2000). Plant-defensin genes introduction for improvement of pear phytopathogene resistance, *Acta Hort.*, ISHS Symp. On Pear Culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Lebedev V.G., Skryabin K.G. & Dolgov S.V. (2000). Transgenic pear clonal rootstocks resistant to herbicide «Basta», *Acta Hort.*, ISHS Symp. On Pear Culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Lebedev V.G., Taran S.A. & Dolgov S.V. (2000). Pear transformation by gene of supersweet protein Thaumatin II for fruit taste modification, *Acta Hort.*, ISHS Symp. On Pear Culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Le Gall O., Torregrosa L., Danglot Y., Candresse T. & Bouquet A. (1994). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of grapevine somatic embryos and regeneration of transgenic plants expressing the coat protein of grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV). *Plant Science*, 102: 161-170.
- Lespinnasse Y. (1989). Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. In: *Integrated control of pome fruit diseases*, Vol. II. Ed. C. Gessler, D.J. Butt, B. Koller, Brissago, Switzerland, October 30- November 4, 1988, pp. 100-115.
- Liu Q., Ingersoll J., Owens L., Salih S., Meng R. & Hammerschlag F. (2001). Response of transgenic Royal Gala apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots carrying a modified cecropin MB39 gene, to *Erwinia amylovora*. *Plant Cell Reports*, 20 (4): 306-12.
- Liu Q., Salih S. & Hammerschlag S. (1998). Etiolation of 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots promotes high-frequency shoot organogenesis and enhanced beta-glucuronidase expression from stem internodes. *Plant Cell Reports*, 18: 32-36.
- Liu Y.G., Shirano Y., Fukaki H., Tasaka M., Tabata S. & Shibata D. (1999). Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning. *Proc. Nat. Ac. of Sciences of the USA*, 96 (11): 6535-6540.

- Luarens F. (1996). Review of the current apple breeding programs in the world: objectives for scion/cultivars improvement. Eucarpia Symp. On Fruit Breeding and genetics. *Acta Hort.*, 484: 163-170.
- Lucca P., Ye X.D. & Potrykus I. (2001). Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular breeding*, 7 (1): 43-49.
- Main G.D., Williamson A., Irvine R.J., Gartland J.S., Fenning T.M., Mala J. & Gartland K.M.A. (1998). In: Davey M.R., Alderson P.G., Lowe K.C., Power J.B. (eds), *Tree biotechnology: towards the millennium*, pp. 315-320.
- Maiss E., Timpe U., Brisske A., Jelkmann W., Casper R. & Himmler G. (1989). The complete nucleotide sequence of plum pox virus RNA. *Journal of General Virology*, 70 (3): 513-524.
- Malinowski T., Zawadzka B., Ravelonandro M. & Scorza R. (1998). Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenic plum by chip bud inoculation of plum pox virus PPV-S. *Acta Virol.*, 42 (4): 241-243.
- Mandegaran Z., Roberts A.V. & Hammatt N. (1999). The ability of *Prunus avium* x *P.pseudocerasus* «Colt» to form somatic embryos *in vitro* contrasts with the recalcitrance of *P. avium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 57-63.
- Manganaris, A.G., Alston, F.H. & Weeden, N.F. (1994). Isozyme locus PGM-1 is tightly linked to a gene (Vf) for scab resistance in apple. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119 (6).
- Manshardt R., Fitch M. & Gonsalves D. (1993). Papaya cultivar (Sunset) with genetically engineered resistance to papaya ringspot virus. USDA-APHIS activities in Hawaii. Univ. of Hawaii Developed technologies. Homepage, 2 pp.
- Mante S., Morgens P.H., Scorza R., Cordts J.M. & Callahan A.M. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) hypocotyl slices and regeneration of transgenic plants. *Bio-Technology*, 9 (9): 853-857.
- Martin R.R. & Ramsdell D.C. (1995). Alternatives to the use of virus coat protein for engineering virus resistance in plants. VIIth International symposium on small fruit virus diseases, 27 Jun. - 2 Jul. 1994, Rome, Italy. *Acta Hort.*, 385: 18-28.
- Martinelli L., Bragagna P., Poletti V. & Scienza A. (1993). Somatic embryogenesis from leaf- and petiole-derived callus of *Vitis rupestris*. *Plant Cell Rep*, 12: 207-210.
- Martinelli L. & Mandolino G. (1996). A study on insertion efficiency of an exogenous gene in a R0 population of grape (*Vitis rupestris* S.). *South African Journal for Enology and Viticulture*, 17: 27-30.
- Martinelli L., Buzkan N., Minafra A., Saldarelli P., Costa D., Poletti V., Festi S., Perl A. & Martelli G.P. (2000). Genetic transformation of tobacco and grapevines for resistance to viruses related to the rugose wood disease complex. In: Bouquet A., Boursiquot J.M. (eds.), Proc. VII<sup>th</sup> Intern. Symp. on Grapevine Genetics and Breeding, ISHS, Vol. I, *Acta Hort.*, 528: 321-327.
- Martinelli L., Candioli E., Costa D., Poletti V. & Rascio N. (2001). Morphogenic competence of secondary somatic embryos with a long culture history. *Plant Cell Reports*, 20: 279-284.
- Martinelli L. & Gribaudo I. (2001). Somatic embryogenesis in grapevine. In *Molecular biology & biotechnology of the grapevine*. Eds. Kalliopi A. e Roubelakis Angelakis, Kluever Acad. Publ., London, pp. 327-351.
- Martinelli L., Gribaudo I., Bertoldi D., Candioli E. & Poletti V. (2001). High efficiency somatic embryogenesis and plant germination in grapevine cvs Chardonnay and Brachetto a grappolo lungo. *Vitis*, 40 (3): 111-115.
- Martinelli L. & Mandolino G. (1994). Genetic transformation and regeneration of transgenic plants of grapevine (*Vitis rupestris* S.), *Theor. Appl. Gen.*, 88: 621-628.
- Mathews H., Dewey V., Wagoner W. & Bestwick R.K. (1998). Molecular and cellular evidence of chimeric tissues in primary transgenics and elimination of chimerism through improved selections protocols. *Transgenic research*, 7 (2): 123-129.

- Mattheus P. (1971). The genetics and exploitation of self-fertility in the sweet cherry. *Eucarpia*, 307-316.
- Matthew A.E., Park J., Polito V.S., Leslie C.A., Uratsu S.L., McGranahan G.H. & Dandekar A.M. (2000). Using GFP as a scorable marker in walnut somatic embryo transformation. *Annals of Botany*, 85: 831-835.
- Matzke A.J.M., Neuhuber F., Park Y.D., Ambros P.F. & Matzke M.A. (1994). Homology dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes. *Molecular and General Genetics.*, 244 (3): 29-229.
- Mauro M.C., Walter B., Pinck L., Valat L., Barbier P., Boulay M. & Coutos-Thevenot P. (1998). Analysis of 41B grapevine rootstocks for grapevine fanleaf virus resistance. Proc., VIIIth Int. Symp. On Grapevine Genetics and Breeding, Montpellier, France, Jul. 6-10, 1998.
- Maximova S.N., Dandekar A.M. & Guiltinan M.J. (1998). Investigation of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple using green fluorescent protein: high transient expression and low stable transformation suggest that factors other than T-DNA transfer are rate-limiting. *Plant Molecular Biology*, 37: 549-559.
- May, G.D., Afza R., Mason H.S., Wiecko A., Novak F.J. & Arntzen C.J. (1995). Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technology*, 13: 486-492.
- McAdam O'Connell D.J., Mac An Saoir S., Copeland R., Evans N. & James D.J. (1998). Progress with genetic transformation of Bramley Seedling apple. In: Davey M.R., Alderson P.G., Lowe K.C., Power J.B. (eds), *Tree biotechnology: towards the millennium*, pp. 277-283
- Mehlenbacher S.A. (1995). Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. *Hort Science*, 30: 466-477.
- Merkulov S.M., Bartish I.V., Dolgov S.V., Pasternak T.P. & McHugen A. (1996). The Genetic Transformation of the Pear *Pyrus communis* L. Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Russian Journal of Genetics*, 34 (3): 289-293.
- Metz P.L.J., Stiekema W.J. & Nap J.P. (1998). A transgene-centered approach to the biosafety of transgenic phosphinothricin-tolerant plants. *Molecular Breeding*, 4 (4): 335-341.
- Meyer P. (1995). Variation of transgene expression in plants. *Euphytica*, 85: 359-366.
- Miles J.S. & Guest J.R. (1984). Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*man A*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.
- Miranda A., Janssen G., Hodges L., Peralta E.G. & Ream W. (1992). *Agrobacterium tumefaciens* transfer extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. *J. of Bacteriology*, Apr. 92: 2288-2297.
- Morel J.B., Mourrain P., Beclin C. & Vaucheret H. (2000). DNA methylation and chromatin structure affect transcriptional and post-transcriptional transgene silencing in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 10 (24): 1591-1594.
- Morgues F., Chevreau E., Lambert C. & De Bondt A. (1996). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation and recovery of transgenic plants from pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Reports*, 16: 245-249.
- Müller M. & Gessler C. (1993). A protein from apple leaves inhibits pectinolytic activity of *Venturia inaequalis* «in vitro». In: *Mechanisms of plant defense response*. Eds.: Fritig B. & Legrand M. Kluwer Academic Publisher.
- Murata M., Haruta M., Murai N., Tanikawa N., Nishimura M., Homma S. & Itoh A. (2000). Transgenic apple (*Malus x domestica*) shoot showing low browning potential. *J. of Agric. and Food Chem.*, 48 (11): 5243-5248.
- Mysore K.S., Bassuner B., Deng X.B., Darbinian N.S., Motchoulski A., Ream W. & Gelvin S.B. (1998). Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 11 (7): 668-683.

- Negri P., Berardi G., Cantoni L., Caccavale L. & Lambardi M. (1997). Pre- and post-infection treatments affecting competence to *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of sweet cherry. Soc. Bot. It. G.L. *Differenziamento e colture di tessuti - Aspetti biotecnologici e molecolari del differenziamento e della rigenerazione* - Sirolo (Ancona) 9-11 Giugno 1997, p. 12.
- Negri P., Cantoni L., Berardi G., Magnanini E. & Sansavini S. (1999). Apple cv «Gala» transformation with rol genes from *Agrobacterium rhizogenes*. *Biologia*, 54 (7 suppl): 49.
- Negri P., Cantoni L., Berardi G., Magnanini E. & Sansavini S. (2000). Rigenerazione di germogli di melo cv. 'Gala' da calli trasformati con geni rol di *Agrobacterium rhizogenes*. *Atti V Giornate Scientifiche S.O.I.*, Sirmione, 28-30 Marzo 2000, pp. 427-428.
- Negri P., Magnanini E., Cantoni L., Berardi G. & Sansavini S. (1998). Piante arboree transgeniche: prime esperienze sul trasferimento di geni di controllo dell'habitus vegetativo. *Riv. Frutticoltura*, 5: 91-97.
- Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A. & Hansen G. (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803.
- Neuhuber F., Park Y.D., Matzke A.J.M. & Matzke M.A. (1994). Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol. Gen. Genetics*, 244 (3): 230-241.
- Norelli J., Aldwinckle H., Destéfano-Beltran L. & Jaynes J. (1993). Increasing the fire blight resistance of apple by transformation with gene encoding antibacterial proteins. *Acta Hortic.*, 338: 385-386.
- Norelli J., Aldwinckle H.S., Destéfano-Beltran & Jaynes J.M. (1994). Transgenic «Malling 26» apple expressing the attacin E gene has increased resistance to *Erwinia amylovora*. *Euphytica*, 77: 123-128.
- Norelli J., Mills J. & Aldwinckle H. (1996). Leaf wounding increase efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of apple. *Hort. Science*, 31 (6): 1026-1027.
- Norelli J.L., Bolar J.P., Harman G.E. & Aldwinckle H.S. (1999). Transgenic apple plants expressing chitinases from *Trichoderma* have increased resistance to scab (*Venturia inaequalis*). Abstract, *Eucarpia Symp. on fruit breeding & genetics*, Dresden, Sept. 1999.
- Palkovics L., Burgyan J. & Balazs E. (1993). Comparative sequence analysis of four complete primary structures of plum.
- Pandolfini T., Rotino G.L., Camerini S., Defez R. & Spena A. (2002). Optimization of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotechnology*, 2: 1 (14 pp.).
- Patocchi A., Gianfranceschi L. & Gessler C. (1999a). Towards the map-based cloning of Vf: fine and physical mapping of the Vf region. *Theor. and Appl. Genet.*, 6 (99): 1012-1017.
- Patocchi A., Vinatzer B., Gianfranceschi L., Tartarini S., Sansavini S. & Gessler C. (1999b). Towards the map-based cloning of Vf: step 4: Chromosome walking. Abstract *5th Workshop on integrated control of pome fruit diseases*. Fontevraud l'Abbaye 24-27 August 1999, p. 54.
- Pérez-Tornero O., Burgos L. & Fisher C. (2000a). Adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. *Acta Hortic.*, 538 (2): 659-662.
- Pérez-Tornero O., Egea J., Vanoostende A. & Burgos L. (2000b). Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from in vitro cultured leaves of apricot. *Plant Science*, 158: 61-70.
- Poggi Pollini C., Bissani R., Giunchedi L., Gambin E. & Goio P. (1996). Sharka: reperimento di un pericoloso ceppo del virus in coltivazioni di pesco. *L'Inf. Agrario*, 32: 77-79.
- Preuss S.B., Jiang C.Z., Baik H.K., Kado C.I. & Britt A.B. (1999). Radiation-sensitive *Arabidopsis* mutants are proficient for T-DNA transformation. *Mol. and Gen. Genet.*, 261: 623-626.
- Puite K., Schaart J., Tobutt K.R. & Alston F.H. (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of the apple cultivars 'Gala', 'Golden Delicious' and 'Elstar', and the strawberry cultivars 'Gariquette', 'Polka' and 'Elsanta'. *Acta Hortic.*, 484: 547-553.

- Ravelonandro M., Teycheney P.Y., Tavert G., Wetzel T., Monsion M., Delbos R. & Dunez J. (1990). Genomic organization of plum pox virus and recombinant DNA technology to combat plum pox virus. IVth Int. Symp. on plum and prune genetics, breeding and pomology, Bordeaux (F), 24-28 July 1989. *Acta Hort.*, 283: 295-304.
- Ravelonandro M., Monsion M., Teycheney P.Y., Delbos R. & Dunez J. (1992a). Construction of a chimeric viral gene expressing plum pox virus coat protein. *Gene*, 120 (2): 167-173.
- Ravelonandro M., Monsion M., Teycheney P.Y., Delbos R.P. & Dunez J. (1992b). Transgenic tobacco plants that contain the plum pox virus (PPV) coat protein gene. XVth Int. Symp. on virus diseases of temperate fruit crops - XVth Int. Symp. on fruit tree diseases, 8-13 July 1991, Vienna. *Acta Hort.*, 309: 191-196.
- Ravelonandro M., Monsion M., Delbos R. & Dunez J. (1993). Variable resistance to plum pox virus and potato virus Y infection in transgenic *Nicotiana* plants expressing plum pox virus coat protein. *Plant Science Limerick*, 91 (2): 157-169.
- Ravelonandro M., Bachelier J., Dunez J., Scorza R., Callahan A., Cordts J. & Gonsalves D. (1995). Genetic engineering plum pox virus coat protein gene in plants. XVIth Int. Symposium on fruit tree virus diseases, 27 June - 2 July 1994, Rome, Italy. *Acta Hort.*, 386: 327-330.
- Ravelonandro M., Scorza R., Bachelier J.C., Labonne G., Levy L., Damsteegt V., Callahan A.M. & Dunez J. (1997). Resistance of transgenic *Prunus domestica* to plum pox virus infection. *Plant Disease*, 81 (11): 1231-1235.
- Ravelonandro M., Scorza R. & Dunez J. (1998). Characterization of phenotype resistance to plum pox of transgenic plums expressing plum pox virus capsid gene. *Acta Virol.*, 42 (4): 270-272.
- Ravelonandro M., Scorza R., Callahan A., Levy L., Jacquet C., Monsion M. & Damsteegt V. (2000). The use of transgenic fruit trees as a resistance strategy for virus epidemics: the plum pox (sharka) model. *Virus research*, 71 (1-2): 63-69.
- Reed J., Privalle L., Powell M.L., Meghji Moez., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Wenck A., Launis K., Kramer C., Chang Y-F, Genevieve H. & Wright M. (2001). Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cellular and Develop. Biology Plant*, 37: 127-132.
- Regner F., da Câmara Machado A., Laimer da Câmara Machado M., Steinkellner H., Mattanovich D., Hanzer V., Weiss H. & Katinger H. (1992). Coat protein mediated resistance to Plum Pox Virus in *Nicotiana clelandii* and *N. benthamiana*. *Plant Cell Reports*, 11: 30-33.
- Reynord J.P., Mourgues F., Norelli J.L., Aldwinckle H.S., Brisset M.N. & Chevreau E. (1999). First evidence for improved resistance to fire blight in transgenic pear expressing the *attacin E* gene from *Hyalophora cecropia*. *Plant Science*, 149: 23-31.
- Rieger M.A., Preston C. & Powles S.B. (1999). Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in Southern Australian cropping systems. *Australian J. of Agric. Res.*, 50 (2): 115-128.
- Rombaldi C.V., Girardi C.L., Bilhalva A.B., Ayub R.A., Leliovère J.M., Latché A., Alibert G. & Pech J.C. (1996). Expressão transitória de um clone de DNA da enzima formadora do etileno em protoplastos de uva. *R. Bras. Fisiol. Veg.*, pp. 201-207.
- Rossi L., Hohn B. & Tinland B. (1996). Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 126-130.
- Rugini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M. & Mariotti D. (1991). Increase of rooting ability in the woody species kiwi (*Actinidia deliciosa* A. chev) by transformation with *Agrobacterium rhizogenes* rol genes. *Plant Cell Report*, 10: 291-5.
- Rugini E., Pilotti M., Testolin R., Cipriani G. & Huang W.G. (1996). Uso di biotecnologie nel miglioramento genetico delle actinidie. In: Costa G., Succi F., Quadretti R., Crociani A., *Atti convegno nazionale: la coltura dell'actinidia*. Faenza 10-12 ottobre, pp. 61-70.

- Sagi L., Panis B., Remy S., Schoofs H., De Smet K., Swennen R. & Cammue B.P. (1995). Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp) via particle bombardment. *Biotechnology (NY)*, 13 (5): 481-5.
- Salamini F. (1998). Biotechnology and molecular biology in practical horticulture. Introductory Lecture. Proceed. XXIV Hortic. Congress., Bruxelles, *Acta Hortic.*, 522, 2000.
- Salamini F. (1999). Where do we go from this point. In Scarascia Mugnozza G.T., Porceddu E., Pagnotta M.A. (Eds.), *Genetics and breeding for crop quality and resistance*, University of Viterbo, Italy. Kleuver Ac. Publ., pp. 397-417.
- Sanford J.C. (1983). Ploidy manipulations. In: *Methods in Fruit Breeding*. Eds. J.N. Moore e J. Janick, Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, pp. 100-123.
- Sangwan R.S., Bourgeois Y., Brown S., Vasseur G. & Sangwan-Norreel B. (1992). Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Ara-bidopsis thaliana*. *Planta*, 188 (3): 439-456.
- Sansavini S. (1998). L'apporto delle nuove biotecnologie al miglioramento genetico e alla trasformazione delle specie da frutto. Pubbl. 1374 del diop. Colt. Arboree. Univ. Bologna e *Riv. Fruttic.*, 5 (98): 69-81.
- Sansavini S. (1999). La sfida delle varietà di melo resistenti ai patogeni. *Riv. Frutticoltura*, 10: 9-18.
- Sansavini S. (2000). Lo stop alle piante transgeniche e agli altri organismi geneticamente modificati. *Riv. Frutticoltura*, 5: 36-43.
- Sassa H., Hirano H., Nishio T. & Koba T. (1997). Style-specific self-compatible mutation caused by deletion of the *S-RNase* gene in Japanese pear (*P. serotina*). *The Plant Journal*, 12 (1): 223-227.
- Schob H., Kunz C. & Meins F. Jr. (1997). Silencing of transgenes introduced into leaves by agroin-filtration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements. *Mol. Gen. Gen.*, 256 (5): 581-585
- Scorza R., Cordts J.M., Mante S., Gonsalves D., Ravelonandro M., Damsteegt V.D., Yepes L.M. & Slightom J.L. (1991). *Agrobacterium*-mediated transformation of plum (*Prunus domestica* L.) with the coat-protein gene of papaya ringspot virus. *3<sup>rd</sup> International Congress on Plant Molecular Biology*, 6-11 October 1991, Tucson, Ariz., U.S.A. Abstract 1167.
- Scorza R., Ravelonandro M., Callahan A.M., Cordts J.M., Fuchs M., Dunez J. & Gonsalves D. (1994). Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Reports*, 14 (1): 18-22.
- Scorza R., Levy L., Damsteegt V., Yepes L.M., Cordts J., Hadidi A., Slightom J. & Gonsalves D. (1995). Transformation of plum with the papaya ringspot virus coat protein gene and reaction of transgenic plants to plum pox virus. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 120 (6): 943-952.
- Scorza R., Cordts J.M., Gray D.J., Gonalves D., Emershad R.L. & Ramming D.W. (1996). Producing transgenic «Thompson Seedless» grape (*Vitis vinifera* L.). *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 12: 616-619.
- Scorza R., Callahan A.M., Levy L., Damsteegt V. & Ravelonandro M. (1997). Transferring Potyvirus coat protein genes through hybridization of transgenic plants to produce Plum Pox Virus resistant plums (*Prunus domestica* L.). *Proc. 17<sup>th</sup> Int. Symp. on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops*, 23-27 June 1997, Bethesda (MD) (in press).
- Scorza R., Callahan A., Levy L., Damsteegt V., Webb K. & Ravelonandro M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum pox potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res.*, 10 (3): 201-209.
- Singh Z. & Sansavini S. (1998). Genetic transformation and fruit crop improvement. In: Janick J. (ed.), *Plant Breeding Reviews*, vol. 16: 87-134.
- Smigocki A.C. & Hammerschlag F.F. (1991). Regeneration of plant from peach embryo cell infected with a shooty mutant strain of *Agrobacterium*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116: 1092-1097.
- Smith E.F. & Townsend C.O. (1907). A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25: 671-673.
- Smyth D.R. (1997). Gene silencing: cosuppression at a distance. *Current Biology*, 7 (12): 793-795.



- Soloki M., Alderson P.G. & Tucker G. (1998). Genetic transformation of grape using *Agrobacterium*, biolistic and silicon carbide whiskers. In: Davey M.R., Alderson P.G., Lowe K.C., Power J.B. (eds), *Tree biotechnology: towards the millennium*, pp. 325-330.
- Sonti R.V., Chiurazzi M., Wong D., Davies C.S., Harlow G.R., Mount D.W. & Signer E.R. (1995). *Arabidopsis* mutants deficient in T-DNA integration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 92 (25): 11786-11790.
- Spena A. & Rotino G.L. (2001). Parthenocarpy: state of the art. In *Current trends in the embryology of angiosperms*. S.S. Bhojwani Ed. (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht), pp. 435-450.
- Skiskandarajah S. & Goodwin P. (1998). Conditioning promotes regeneration and transformation in apple leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 53: 1-11.
- Stam M., Mol J.N.M. & Kooter J.M. (1997). The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany.*, 79 (1): 3-12.
- Sundberg C., Meek L., Carrol K., Das A. & Ream W. (1996). VirE1 protein mediates export of the single-stranded DNA-binding protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into Plant Cells. *Journal of Bacteriology*, 178 (4): 1207-1212.
- Tang H., Ren Z. & Krczal G. (2000). Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.). *Scientia Hort.*, 83: 109-126.
- Tao R., Dandekar A.M., Uratsu S.L., Vail P.V. & Tebbets J.S. (1997). Engineering genetic resistance against insects in Japanese persimmon using the *cryIA(c)* gene of *Bacillus thuringiensis*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 122 (6): 764-771.
- Tartarini S. (1996). RAPD markers linked to the Vf gene for scab resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 803-810.
- Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S. & Gessler C. (1999). Development of reliable PCR markers for the selection of the Vf gene conferring scab resistance in apple. *Plant. Breed.*, 118: 183-186.
- Tassinari P., Zuccherelli S. & Sansavini S. (2001). Contributo allo studio delle basi biologico-molecolari dell'incompatibilità gametofitica del pero (*P. communis*)., *Riv. Frutticoltura*, 6: 81-86.
- Tinland B., Schoumacher F., Gloekler V., Bravo-Angel A.M. & Hohn B. (1995). The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for precise integration of T-DNA into the plant genome. *EMBO J.*, 14: 3585-3595.
- Ulker B., Allen G.C., Thomson W.F., Spiker S. & Weissinger A.K. (1999). A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. *Plant Journal.*, 18 (3): 253-263.
- Vain P., Worland B., Kohli A., Snape J.W., Christou P., Allen G.C. & Thomson W.F. (1999). Matrix attachment regions increase expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant Journal.*, 18 (3): 233-242.
- Van Nerum I., Incerti F., Keulemans J. & Broothaerts W. (2000). Analysis of self-fertility in transgenic apple lines transformed with an S-allele either in sense or antisense direction. *Acta Hort.*, 538: 625-629.
- Van Nerum I., Keulemans J. & Broothaerts W. (2000). Can we develop self-fertile fruit trees through genetic engineering? *Acta Hort.*, ISHS Symp. on pear culture, Ferrara, Sept. 2000, *in press*.
- Van Tuyl J.M., Marcucci M.C. & Visser T. (1982). Pollen and pollination experiments. VII. The effect of pollen treatment and application method on incompatibility and incongruity in *Lilium. Euphytica*, 31: 613-619.
- Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L. & Rocha-Sosa M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 220: 245-250.

- Varrelmann M. & Maiss E. (2000). Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.*, 81 (3): 567-576.
- Varrelmann M., Palkovics L. & Maiss E. (2000). Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of Plum Pox Virus. *J. Virol.*, 74 (16): 7462-7469.
- Villemont E., Dubois F., Sangwan R.S., Vasseur G., Bourgeois Y. & Sangwan-Norreel B.S. (1997). Role of the host cell cycle in the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Petunia*: evidence of an S-phase control mechanism for T-DNA transfer. *Planta*, 201 (2): 160-172.
- Vinatzer B. (1999). *Molecular Characterization of the Vf scab resistance gene*, tesi di Dottorato di ricerca in biotecnologie cellulari e molecolari, XI Ciclo, Università degli Studi di Bologna.
- Vinatzer B., Zhang H.B. & Sansavini S. (1998). Construction and characterisation of a bacterial artificial chromosome library of apple. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1183-1190.
- Vinatzer B., Patocchi A., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.B., Gessler C. & Sansavini S. (2001). Apple contains receptor-like genes homologous to the *Cladosporium fulvum* resistance gene family of tomato with a cluster of genes cosegregating with *Vf* apple scab resistance. *MPMI*, Vol. 14, No. 4, pp. 508-515.
- Visser T. (1981). Pollen and pollination experiments. IV. 'Mentor' and 'pionerpollen' techniques regarding incompatibility and incongruity in apple and pear. *Euphytica*, 30: 363-369.
- Voinnet O. & Baulcombe D.C. (1997). Systemic signalling in gene silencing. *Nature-London*, 389: 6651-6653.
- Wang A.S., Evans R.A., Altendorf P.R., Hanten J.A., Doyle M.C. & Rosichan J.I. (2000). A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts. *Plant Cell Reports*, 19: 654-660.
- Wassenegger M. & Pelissier T. (1998). A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 37 (2): 349-362.
- Waterhouse P.M., Graham M.W. & Wang M.B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. USA*, 95 (23): 13959-13964.
- Williams EB. & Kuc, J. (1969). Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*. *Rev Phytopath.*, 7: 223-246.
- Wilson F.M. & James D.J. (1998). Regeneration and transformation of apple cultivar Falstaff. In: Davey M.R., Alderson P.G., Lowe K.C., Power J.B. (eds), *Tree biotechnology: towards the millennium*, pp. 95-100.
- Xu M.L. & Korban S.S. (2000). Saturation mapping of the apple scab resistance gene *Vf* using AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 844-851.
- Yang H.Y. & Kruger J. (1994). Identification of a RAPD marker linked to the *Vf* gene for scab resistance in apples. *Plant breed.*, 112: 323-329.
- Yao J.L., Cohen D., Atkinson R., Richardson K. & Morris B. (1995). Regeneration of transgenic plants from the commercial apple cultivar Royal Gala. *Plant Cell Rep.*, 14: 407-412.
- Yao J.L., Cohen D., Van den Brink R. & Morris B. (1999). Assessment of expression and inheritance patterns of three transgenes with the aid of techniques for promoting rapid flowering of transgenic apple trees. *Plant Cell Reports*, 18 (9): 727-732.
- Yeh S.D., Bau H.J., Cheng Y.H., Yu T.A. & Yang J.S. (1998). Greenhouse and field evaluations of coat-protein transgenic papaya resistant to papaya ringspot virus. *Acta Hort.*, 461: 321-328.
- Zhu L., Holefors A., Ahlman A., Xue Z-T. & Welander M. (2001). Transformation of the apple rootstock M.9/29 with the rolB gene and its influence on rooting and growth. *Plant Science*, 160 (3): 433-439.
- Ziemienowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B. & Rossi L. (2001). Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of *virD2* and *virE2* proteins. *The Plant Cell*, 13: 369-83.
- Zupan J.R. & Zambryski P. (1995). Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.*, 107: 1041-1047.