

# La trasformazione genetica nella vite: applicazioni, benefici e rischi

**Bruno Mezzetti<sup>1</sup>, Palma Daniela<sup>1</sup>, Oriano Navacchi<sup>2</sup>, Tiziana Pandolfini<sup>3</sup>,**

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), Università Politecnica delle Marche. Email: [b.mezzetti@univpm.it](mailto:b.mezzetti@univpm.it)

<sup>2</sup>Vitroplant International, Cesena

<sup>3</sup>Dipartimento di Biotecnologie, Università di Verona. Email: [tiziana.pandolfini@univr.it](mailto:tiziana.pandolfini@univr.it)

## Introduzione

Grandi progressi sono stati ottenuti in agricoltura durante gli anni settanta grazie alla così detta *green revolution* e ai molteplici risultati ottenuti attraverso il miglioramento genetico classico, tuttavia risulta evidente che ulteriori aumenti di produttività e qualità delle colture possono essere ottenuti in futuro principalmente attraverso l'uso dell'ingegneria genetica in agricoltura. Nelle piante, l'ingegneria genetica viene utilizzata per trasferire nella specie di interesse uno o più geni che possano conferire caratteristiche agronomiche favorevoli. Per il trasferimento del materiale genetico vengono applicati specifici protocolli di trasformazione e rigenerazione, in genere ottimizzati per le singole specie e varietà di interesse. In vite l'utilizzo di un approccio transgenico permette di modificare tratti come la resistenza a malattie, migliorare la qualità e la produzione con la possibilità di cambiare solo il tratto di interesse mantenendo le caratteristiche delle diverse cultivar. Per il trasferimento dei geni in pianta, innanzitutto occorre isolare e caratterizzare i geni di interesse che codificano per tratti utili e avere un sistema di trasformazione e rigenerazione valido (Vivier *et al.*, 2000). Per quanto riguarda la disponibilità di geni di interesse gli studi già approfonditi sul genoma della vite offrono un'ampia disponibilità di informazioni che permettono l'identificazione di sequenze geniche utili per controllare diversi caratteri importanti la cui funzione deve essere però validata con esperimenti che comprendono anche la stessa trasformazione genetica. Per quanto riguarda il metodo di trasformazione, la vite è però considerata una specie recalcitrante a causa delle difficoltà di mettere a punto un protocollo di rigenerazione e selezione efficiente per questa specie (Perl e Eshdat, 1998). I metodi di trasformazione genetica più utilizzati in vite sono la trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens* e il bombardamento con microproiettili, che costituisce la tecnica biolistica.

Tra le principali aree di studio nel miglioramento genetico della vite possiamo includere la gestione delle malattie e lo sviluppo e la qualità delle bacche. La vite è esposta a molti stress biotici causati da insetti dannosi, funghi, batteri, citoplasmi e virus, che sono responsabili di elevate perdite economiche e richiedono l'utilizzo di prodotti agrochimici a livello estensivo. Le piante hanno evoluto una serie di meccanismi per contrastare gli attacchi da parte di batteri, patogeni fungini, virus

e insetti. La parete cellulare è la prima linea di difesa contro l'ambiente esterno, quindi le piante hanno sviluppato dei sistemi di percezione e di difesa contro le modificazioni sia meccaniche che chimiche associate alla penetrazione del patogeno. In vite, come nella maggioranza delle piante, la deposizione di lignina insieme ad altri componenti fenolici, accompagnati da un'alta attività perossidasi e la produzione di fitoalessine rappresentano componenti importanti della risposta di difesa innata (Kortekamp, 2006). I sistemi di difesa attiva invece sono solitamente mediati da geni di resistenza della pianta (geni R) (Jones e Dangle, 2006; Robatzek e Bittel, 2007). La difesa delle piante dalle malattie richiede lo sviluppo di nuovi strumenti di lotta da impiegare in strategie alternative all'utilizzo di prodotti chimici che comportano un elevato rischio per l'ambiente e per la salute dei consumatori, le biotecnologie possono contribuire a creare varietà resistenti. Per quanto riguarda l'applicazione dell'ingegneria genetica al miglioramento della qualità delle bacche, i pochi esempi presenti in letteratura riguardano principalmente gli aspetti riguardanti lo sviluppo del colore, il metabolismo degli zuccheri e l'apirenia nelle varietà di uva da tavola (Perl *et al.*, 2000).

### **Esempi di conferimento di resistenza ai virus della vite tramite tecniche di ingegneria genetica**

Negli anni tra il 1980 e 1990, il successo dell'ingegneria genetica nello sviluppo di piante resistenti a virus, ha annunciato una nuova era nel controllo delle malattie virali (Fuchs e Gonzalves, 2007). Infatti numerosi esperimenti dimostrarono che era possibile conferire resistenza a virus tramite l'espressione in pianta di costrutti contenenti geni virali interi o porzioni troncate di geni virali, come ad esempio geni codificanti per le proteine del capsido, RNA polimerasi RNA dipendente, proteine del movimento ecc. Tra i primi esempi si possono citare i lavori di Powel e collaboratori (Powel *et al.*, 1986) che riguardavano esperimenti con piante di tabacco che esprimevano la proteina di rivestimento del virus del mosaico del tabacco (TMV, Tobacco Mosaic Virus). Le piante transgeniche, mostravano quando venivano inoculate con il virus, un ritardo nell'espressione dei sintomi rispetto alle piante di controllo non trasformate. Successivamente i risultati di Powell vennero confermati in altre specie e fu anche dimostrato che piante transgeniche che esprimevano il gene della proteina di rivestimento di un virus potevano acquisire resistenza non solo nei confronti di quel virus, ma anche verso virus che presentavano elevate omologie di sequenza nel gene per la proteina di rivestimento (Fuchs e Gonzalves, 2007). I primi tentativi di indurre resistenza ai virus della vite utilizzarono costrutti genici senso o antisense contenenti sequenze omologhe a regioni dei geni per le proteine capsidiche, geni della RNA polimerasi RNA-dipendente o geni di proteine di movimento. Queste strategie venivano adottate con lo scopo di bloccare il ciclo vitale e riproduttivo del virus, rendendo così la pianta transgenica resistente. Molti di questi lavori hanno descritto la trasformazione di piante modello come *N. benthamiana* e solo in pochi casi è riportato il trasferimento dei costrutti antivirali anche in portainnesti o cultivar di vite. Ciò è dovuto alla difficoltà intrinseca di trasformazione e rigenerazione di questa specie e ai tempi lunghi per arrivare a condurre gli esperimenti di resistenza sulle piante ambientate.

Bardonnier e collaboratori (1994) hanno riportato un significativo ritardo nell'infezione sistemica di GFLV, nelle piante di *N. benthamiana* che esprimevano il gene della proteina del capsido; ma non fu osservata nelle piante transgeniche resistenza incrociata nei confronti di ArMV. Alti livelli di resistenza nei confronti di GFLV furono riportati anche da Monier e collaboratori (Monier *et al.*, 2000) in piante transgeniche di *N. benthamiana* che esprimevano sequenze non traducibili del gene della proteina del capsido di GFLV. Gambino e collaboratori (2010) trasformarono otto linee di vite con il gene della proteina del capsido di GFLV e analizzarono i trasformanti cercando una correlazione tra l'espressione del transgene, la produzione di siRNA e la metilazione del DNA. Nel caso del silenziamento genico si può infatti avere inibizione della trascrizione dovuta alla metilazione del DNA prodotta per azione dei siRNAs. In tre linee di vite che non esprimevano il transgene fu osservata metilazione della citosina nella sequenza contenente il gene della proteina del capsido, nel terminatore T7 della sequenza e nel promotore 35S e nessuna produzione rilevabile di siRNA. Dopo inoculo con il virus non si sono osservate variazioni nel livello di metilazione della citosina, ma piante transgeniche e non, mostravano una produzione di siRNA, da 21–22 nucleotidi, indicando così che le piante stavano rispondendo all'infezione virale, attivando un meccanismo di silenziamento post-trascrizionale. L'inibizione dell'espressione del transgene, probabilmente causata dalla metilazione del suo DNA, potrebbe spiegare perché le piante transgeniche innestate sopra portainnesti infettati con il virus non erano in grado di impedire la trasmissione del virus. A questo riguardo risulta interessante nell'ambito della trasformazione della vite il lavoro di trasformazione genica e successiva caratterizzazione molecolare eseguito da Maghuly *et al.*, 2006. In questa ricerca sono state ingegnerizzate, attraverso una trasformazione mediata da *A. tumefaciens*, piante della varietà Russalka (*Vitis vinifera*) per la resistenza al virus GFLV tramite l'introduzione di differenti costrutti contenenti il gene codificante per la proteina capsidica del virus (gene *GFLV CP*) o forme non traducibili o tronche. L'interesse di tale lavoro è legato al fatto che dalla caratterizzazione molecolare più del 46% delle linee transgeniche testate hanno rivelato la presenza di una sola copia del costrutto; risultato importante visto che bassi livelli d'espressione sembrano essere correlati ad un elevato numero di copie del transgene inserite e dunque, al fenomeno del “gene-silencing” (Flavell, 1994; Vaucheret *et al.*, 1998). Tuttavia, i risultati delle prove di infezione per determinare quali delle linee mostrassero un fenotipo resistente, non sono state fino ad ora pubblicate. Nel caso del lavoro di Jardak-Jamoussi (Jardak-Jamoussi *et al.*, 2009) venne sviluppato un costrutto a forcina (costrutto ad hairpin o ad inverted repeats) per l'induzione del silenziamento ad RNA. Il costrutto conteneva una ripetizione invertita composta da sequenze derivate di GFLV, per il conferimento in vite di resistenza nei confronti della sindrome dell'arricciamento fogliare. Il costrutto, contenente frammenti di una regione conservata del gene della proteina del movimento di GFLV, presente in un isolato tunisino, fu trasferito in *N. benthamiana* mediante l'utilizzo di *A. tumefaciens*. La prova di infezione delle piante di *N. benthamiana* della generazione T1 ha mostrato nelle piante transgeniche resistenza, ritardo nell'infezione, ma anche casi di suscettibilità in alcune linee. Attraverso l'analisi northern

blot, utilizzando come sonda una sequenza derivata da virus, è stato possibile individuare, dopo infezione con GFLV, specifici siRNA nelle piante trasformate resistenti di *N. benthamiana*, a conferma che la resistenza era dovuta ad un meccanismo di silenziamento ad RNA. Inoltre cellule embriogeniche di vite furono trasformate con lo stesso costrutto, usando *A. tumefaciens*. Attraverso northern blot furono rilevati differenti livelli di espressione del transgene in linee indipendenti di viti trasformate, indicando la presenza di silenziamento genico. Nell'articolo tuttavia non vengono descritti esperimenti per valutare il grado di resistenza al virus delle viti transgeniche.

Per quanto riguarda la resistenza a GLRaV Ling e collaboratori (Ling *et al.*, 2008), trasformarono piante di *N. benthamiana*, inserendo il gene virale della proteina del capsido di GLRaV-2. La resistenza al virus è stata poi valutata sulle piante transgeniche facendo delle prove di infezione con GLRaV-2, ed effettivamente le piante risultavano resistenti al virus. L'analisi dell'espressione della proteina del capsido, eseguita tramite northern blot ha dimostrato che la resistenza nei confronti del virus nelle piante trasformate era associata a bassi livelli del trascritto del transgene.

Un diverso approccio per il conferimento di resistenza al GFLV e ArMV è stato utilizzato da Nolke e collaboratori (Nolke *et al.*, 2009). L'obiettivo del loro lavoro è stato quello di utilizzare anticorpi monoclonali diretti contro la proteina del capsido di GFLV che mostravano reattività incrociata nei confronti di *Arabis mosaic virus*. È stato prodotto un costrutto esprimente un frammento anticorpale a singola catena posto sotto il controllo del promotore CaMV35S, con l'obiettivo di creare piante transgeniche di *N. benthamiana*. Dall'esperimento si notò che le piante delle generazioni T1 e T2 mostravano resistenza parziale o completa nei confronti dell'agente patogeno virale; la resistenza nei confronti di GFLV nelle piante transgeniche era strettamente legata alla presenza del frammento anticorpale a singola catena, a conferma del fatto che l'anticorpo era funzionale in pianta e responsabile della resistenza verso GFLV. Inoltre le piante transgeniche oltre ad una resistenza totale nei confronti di GFLV, hanno mostrato anche una resistenza parziale nei confronti di ArMV.

## **Il programma di resistenza a virus in vite avviato in Italia**

Il silenziamento genico ad RNA ("RNA silencing") è un processo naturale di controllo dell'espressione genica, presente in organismi animali, funghi e piante che rappresenta un meccanismo di difesa contro la presenza nella cellula di "RNA aberrante. L'RNA silencing può causare sia l'inibizione della trascrizione (transcriptional gene silencing) di un mRNA oppure la sua degradazione o ancora può bloccarne la traduzione (PTGS). All'interno della cellula gli "RNA aberranti" a doppio filamento (dsRNA) vengono tagliati ad opera di un enzima del tipo delle RNasi III, chiamato DICER, producendo piccoli RNA (small interfering RNA, siRNA) a doppio filamento di 21-23 nucleotidi (Zamore, 2002). Fonti di dsRNA possono essere gli RNA virali che vengono riconosciuti come estranei, ma anche intermedi aberranti provenienti da sequenze ripetitive e da RNA di trascritti con sequenze omologhe o infine piccoli RNA trascritti, che possono formare strutture secondarie con intermedi a dsRNA chiamati miRNA (microRNA) (Colombo, 2006) Nelle piante

l'RNAi si diffonde da cellula a cellula molto probabilmente attraverso i plasmodesmi e a lunga distanza attraverso il sistema vascolare (Baulcombe, 2004; Voinnet, 2005). Il silenziamento ad RNA rappresenta un meccanismo di risposta alle infezioni virali evolutosi principalmente negli organismi vegetali (Baulcombe, 1999) che si attiva in risposta a RNA aberranti o RNA a doppio filamento (dsRNA) che si accumulano durante la replicazione del virus. Il silenziamento del gene può essere attivato in maniera naturale dalle piante infettate dai virus o in piante transgeniche quando il transgene esprime sequenze virali (Ruiz *et al.*, 1998).

Uno dei motivi principali nell'utilizzo di tecniche di trasformazione genetica per conferire la resistenza contro virus nasce dall'assenza di trattamenti chimici efficaci contro le infezioni virali e la quasi totale assenza di fonti di resistenza contro la maggior parte delle principali malattie virali in piante coltivate (Beachy, 1993, Baulcombe, 1994).

Presso l'Università Politecnica delle Marche (UNIVPM) in collaborazione con l'Università di Verona (UNIVR) e Vitroplant International di Cesena si è avviato un programma di ricerca finalizzato al conferimento di una resistenza multipla a virus in vite tramite il metodo del silenziamento genico a RNA.

Per questo obiettivo è stato realizzato un costrutto genico ad hairpin disegnato per indurre il silenziamento genico post-trascrizionale (PTGS) verso tre virus della vite: GFLV, ArMV responsabili del complesso dell'arricciamento e GLRaV associato alla malattia dell'accartocciamento fogliare. È stato dimostrato che i costrutti che esprimono in pianta trascritti a forcina, denominati hairpin RNA (hpRNA), inducono con alta efficienza il silenziamento genico (Smith *et al.*, 2000; Wesley *et al.*, 2001; Pandolfini *et al.*, 2003). Gli hpRNAs contengono due regioni complementari al gene bersaglio poste in senso invertito e separate da un introne e formano una struttura a forcina contenente una regione di RNA a doppio filamento. Nel nostro costrutto le regioni ad hairpin sono state disegnate con lo scopo di silenziare i geni della RNA polimerasi RNA dipendente (RpRd) di GFLV e GLRaV3, per poter conferire una resistenza multipla a queste virosi.

Esperimenti di trasformazione genetica sono stati realizzati su due cultivar di vite (Pinot noir e Corvina) ed un portinnesto (1103 Paulsen) applicando il metodo descritto da Mezzetti *et al.*, (2002) su materiale vegetale di partenza, consistente in ammassi meristematici, prodotto dalla Vitroplant s.p.a. Lo sviluppo degli ammassi meristematici ha previsto esecuzione di quattro sub-culture a partire dai germogli avventizi proliferati *in vitro*. In ognuna delle sub-culture si è favorita la proliferazione basale e l'ipertrofia delle cellule parenchimatiche a discapito della dominanza apicale. In circa 90 giorni si è verificato il completo disseccamento ed eliminazione dell'apice attraverso la somministrazione, periodica e crescente, di N<sup>6</sup>- benzil adenina (da 4.4 µM a 13.2 µM) nel mezzo di coltura. In un intervallo di tempo abbastanza limitato, si è dunque ottenuta una massa meristematica che, una volta ripartita in piccoli frammenti (1 cm<sup>2</sup>, 2 mm di spessore) acquisisce un'alta competenza rigenerativa e diventa materiale di partenza ottimale sia per trasformazione genetica che per la micropropagazione (Figura 1).

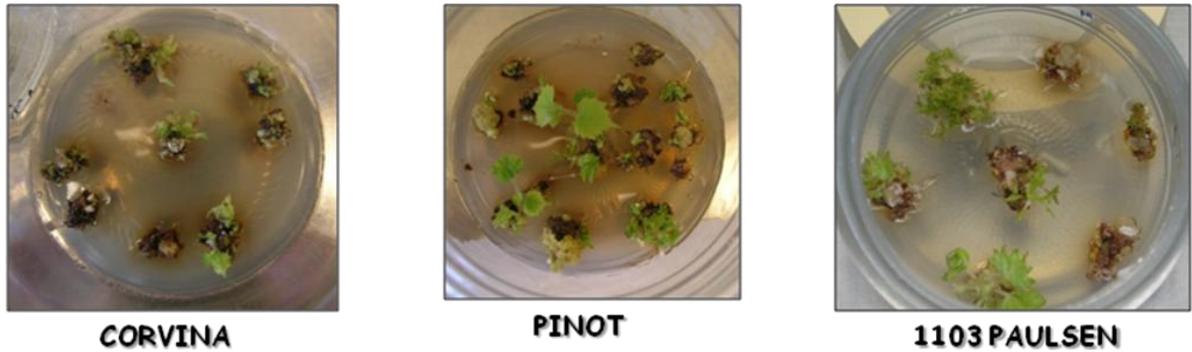


Figura 1. Esempio di sezioni in fase di rigenerazione e selezione su terreno Vitroplant con kanamicina.

Questi tessuti vegetali sono stati utilizzati per effettuare gli esperimenti di trasformazione con il costrutto antivirale *hpViruses GFLV-GLRaV*. L'utilizzo delle due varietà, Corvina o Pinot noir, è motivato dal fatto di voler verificare l'efficacia del costrutto di silenziamento direttamente sulle varietà. Inoltre, poiché nelle specie in cui questo approccio è già stato sperimentato, il fenomeno della resistenza ai virus basata sul *silencing* ha carattere sistemico, quindi si manifesta anche nelle parti della pianta che non sono interessate inizialmente dall'infezione, si è voluto trasformare anche un portainnesto, il 1103 Paulsen, di elevato interesse commerciale per provare la possibile induzione di resistenza sistemica nelle marze. La risposta di resistenza rilevata dalle varietà transgeniche può presentare maggiori problemi di accettabilità in quanto anche il prodotto, l'uva, risulterebbe geneticamente modificato. La possibilità di avere un portainnesto transgenico capace di trasmettere la resistenza nel nesto risulterebbe di più facile valutazione per quanto riguarda i rischi, come richiesto per le piante geneticamente modificate, e conseguentemente anche per quanto riguarda l'accettabilità del consumatore. Da ricordare poi il possibile notevole vantaggio vivaistico che può derivare dalla disponibilità di un portainnesto in grado di trasmettere resistenza a virus alle principali varietà di uva da vino coltivate.

Come risultato di questo lavoro sono attualmente disponibili due putative linee transgeniche della varietà Corvina radicate che sono state analizzate tramite analisi PCR. Le due linee di Corvina, trasformate con il costrutto *hpViruses GFLV-GLRaV*, e radicate in kanamicina 50 mg/l, sono risultate positive all'analisi PCR utilizzando primers specifici che consentono di amplificare la sequenza di 402 bp corrispondente ad un "braccio" del costrutto *hpViruses GFLV-GLRaV* e i primer identificanti la sequenza (540 bp) del gene marcatore per la resistenza alla kanamicina (*nptII*).

### **Il programma di silenziamento genico vite per lo sviluppo del frutto avviato in italia**

Un altro obiettivo che l'UNIVPM, l'UNIVR e Vitroplant si sono posti, è stato quello identificare in vite gli orologi dei geni *AUCSIA* di pomodoro e sviluppare un metodo di trasformazione genetica

in vite per studiarne la funzione tramite il silenziamento genico. I geni *AUCSIA* di pomodoro sono espressi principalmente nelle gemme fiorali e la loro espressione è down-regolata dopo la fertilizzazione. La soppressione dei geni *AUCSIA* in pomodoro, ha causato lo sviluppo di frutti partenocarpici e un accumulo di auxina nelle gemme fiorali (Molesini *et al.*, 2008), dimostrando che i geni *AUCSIA* di pomodoro sono coinvolti nel metabolismo delle auxine durante lo sviluppo del frutto. Lo studio degli ortologi in vite potrebbe far luce sui processi che regolano il processo dello sviluppo del frutto in questa specie. Per questo obiettivo è stato realizzato un costrutto genico ad hairpin disegnato per indurre il PTGS verso il gene *VvAUCSIA1* e sopprimerne la funzione. Il costrutto è stato utilizzato per le prove di trasformazione genetica sulla cultivar da tavola a bacca nera di *Vitis vinifera* Vitroblack. Il metodo di trasformazione seguito è quello descritto da Mezzetti *et al.*, 2002, come citato in precedenza per il lavoro riguardante il silenziamento genico in vite per la resistenza a virus. Sono state ottenute sette linee radicate (Fig.3) che sono state analizzate tramite analisi PCR.



Figura 3: sezioni in fase di rigenerazione e selezione su terreno Vitroplant s.p.a. con kanamicina a 25 mg/ml.

### **Altri esempi di applicazione delle tecniche di ingegneria genetica per il miglioramento della vite**

Gli esempi di utilizzazione dell'ingegneria genetica in vite per il miglioramento di tratti fenotipici legati alla produttività o alla resistenza agli stress abiotici sono limitati, ne riportiamo alcuni qui di seguito riguardanti la tolleranza agli erbicidi, la resistenza al freddo, all'anossia e la regolazione della fertilità.

Mulwa e collaboratori (Mulwa *et al.*, 2007) hanno trasformato la cultivar Chancellor con il gene *tfdA*, per la tolleranza all'erbicida 2,4-D. L'erbicida 2,4-D è molto utilizzato per il controllo delle erbe infestanti e produce sulle foglie e/o sui germogli della vite segni ben marcati ed evidenti, con sintomatologia in progressione in base alla "quantità" di prodotto utilizzato. Si va da lievi e transitorie deformazioni ad effetti più marcati: le lamine fogliari si ispessiscono, i margini si ripiegano verso il basso, lo sviluppo si riduce, proseguendo poi, nella scala della gravità, si arriva ad avere veri e propri disseccamenti e distruzione dei giovani grappolini (Lorenzini, 2005). Calli embriogenetici sono stati infettati con l'*A. tumefaciens* portante il costrutto pAL4404::*tfdA*. Sono

state effettuate prove di resistenza al 2,4-D ( $10 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ ) sulle piante trasformate, le quali hanno mostrato resistenza al prodotto.

Poiché in alcune aree di coltivazione della vite i danni che possono essere causati dal freddo invernale sono i fattori più significativi nel limitare la produzione, Tsvetkov (Tsvetkov *et al.*, 1998) e Goturanov (Goturanov *et al.*, 2001), hanno sviluppato un progetto riguardante la trasformazione genetica di *Vitis vinifera* cultivar Rusalka, con tre differenti costrutti portanti la sequenza di un gene che codifica per una proteina di un pesce artico che ha funzioni protettive nei confronti dello stress da gelo. Le analisi PCR e southern blot, in cui stato usato il gene nptII come sonda, hanno mostrato che le piante transgeniche contengono la sequenza del gene desiderato.

Un altro lavoro interessante è stato proposto da Tesnière e collaboratori (Tesnière *et al.*, 2006): l'obiettivo è stato quello di studiare in vite, il ruolo dell'alcol deidrogenasi (*Adh*) nello sviluppo della pianta e in risposta a stress abiotici. In vite, i geni *Adh* appartengono a una piccola famiglia multigenica che è stata ben caratterizzata (Tesnière e Verries, 2001; Verries *et al.*, 2004; Tesnière *et al.*, 2005). Tra questi geni, il *VvAdh2* è stato descritto come quello espresso durante la fase di maturazione della bacca (Tesnière e Verries, 2000). Inoltre, dati recenti suggeriscono che la regolazione dell'espressione di questo gene possa essere in parte legata al metabolismo dell'etilene (Tesnière *et al.*, 2004). Piante di *V. vinifera* sono state trasformate con costrutti contenenti il gene *Adh2* di *V. vinifera* in senso o in antisenso sotto il controllo del promotore costitutivo CaMV35S. Dopo la caratterizzazione molecolare delle piante rigenerate, è stato studiato in foglie l'effetto della overespressione e del silenziamento del gene *Adh2* in risposta allo stress abiotico indotto dalla carenza di ossigeno e sul contenuto di zuccheri e alcuni metaboliti secondari. Le piante che overesprimono il gene *Adh2* mostravano alti livelli costitutivi dell'attività enzimatica dell'*Adh2*, che non aumenta comunque in condizioni di carenza di ossigeno, un contenuto minore di saccarosio e un generale aumento dei composti volatili. Le linee trasformate con il costrutto antisenso non hanno mostrato alcun cambiamento dell'attività enzimatica in condizioni di carenza di ossigeno e nel contenuto di saccarosio e metaboliti secondari. In generale non ci sono differenze significative tra le linee trasformate con il costrutto senso e antisenso per quanto riguarda il contenuto il carotenoidi e clorofilla, suggerendo una forte regolazione del metabolismo della sintesi di questi composti.

Di particolare interesse per il miglioramento dello sviluppo della bacca è la modificazione della sintesi di auxina a livello delle gemme fiorali e delle bacche durante lo sviluppo. Utilizzando il costrutto genico *DefH9-iaaM*, che permette la produzione localizzata di acido indolacetico nell'ovulo e nella placenta, sono state prodotte linee transgeniche di vite che presentano aumentata fertilità, aumento del numero di acini per grappolo e variazioni nelle dimensioni degli acini (Costantini *et al.*, 2007).

**Accettabilità e interesse per piante da frutto geneticamente modificate per la nostra agricoltura**

L'applicazione delle tecnologie di modificazione genetica nelle piante solleva diverse preoccupazioni nell'opinione pubblica. In generale, le problematiche che più suscitano dibattito riguardano la sicurezza per la salute dell'uomo, per l'ambiente e soprattutto per i sistemi agricoli locali. Per quanto riguarda la salute dell'uomo, la maggiore preoccupazione è data dalla diffusione dei geni per la resistenza ad antibiotici, aspetto, questo ultimo, che per le piante da frutto è particolarmente importante per le problematiche della selezione dei rigeneranti.

La possibilità di diffondere geni con il polline delle piante da frutto è una realtà che può interessare in modo diverso le varie specie o il tipo di pianta (chiaramente non è un problema per i portinnesti). Attualmente non ci sono possibilità concrete di controllare la dispersione di polline, se non la coltivazione in ambiente protetto. In definitiva il rischio ambientale connesso alla diffusione di polline di piante geneticamente modificate (GM) dipende dalla diffusione negli ambienti circostanti di specie autoctone compatibili, cosa non molto frequente per molte specie frutticole; tale rischio deve essere posto al pari di quello che può derivare dall'introduzione di nuove specie esotiche (Gartland et al., 2003). Il ciclo poliennale e la propagazione clonale, non per seme, già di fatto riduce comunque rispetto alle piante annuali il rischio di diffusione nell'ambiente delle piante da frutto GM.

Nel nostro paese, la percezione del rischio rappresentato dall'introduzione delle piante GM è spesso associata al danno che esse possono recare all'immagine delle nostre produzioni agricole di qualità e molto spesso riconosciute con marchi anche importanti. L'agricoltura del nostro paese è da molti considerata incompatibile con la tipologia di agricoltura intensiva-estensiva connessa alla agricoltura GM. Attualmente le coltivazioni GM vengono esclusivamente messe in relazione lavoro agli interessi di multinazionali straniere; è, invece, importante evidenziare che anche nel nostro paese si può favorire lo sviluppo delle biotecnologie vegetali con programmi finalizzati a risolvere problemi specifici della nostra agricoltura e quindi per la salvaguardia o maggiore competitività dei nostri prodotti (Basso et al., 2003). La vite, ad esempio, presenta delle problematiche prioritarie difficili da superare con le sole tecniche tradizionali di incrocio e selezione, quali ad esempio la suscettibilità a malattie. Tuttavia il problema principale di accettabilità non si identifica con reali rischi biologici per l'uomo o per l'ambiente, ma solo con i rischi di tipo commerciale derivanti da potenziali contaminazioni dei prodotti biologici o tipici situati in vicinanza di coltivazioni GM. In questo ambito gli studi sulla coesistenza tra questi due sistemi di produzione sono comunque di fondamentale importanza ed anche in questo le sperimentazioni di campo sono necessarie per identificare i limiti di accettabilità e diffusione di questi due sistemi di coltivazione. Da sperimentazioni effettuate in diversi paesi europei sono già disponibili dati che hanno dimostrato la possibilità della coesistenza tra questi sistemi di coltivazione.

#### **Quadro normativo di riferimento per la sperimentazione e coltivazione delle piante OGM**

L'attuale situazione regolamentare in materia d'immissione nell'ambiente (sperimentazione e commercializzazione) di organismi geneticamente modificati si identifica con un complicato quadro giuridico. Nel 2001, la Commissione Europea, nell'intento di offrire un approccio affidabile e sicuro sugli OGM, ha approvato un importante pacchetto legislativo che traccia un sistema di controlli e regole per la sperimentazione, il commercio e l'etichettatura di tali prodotti allo scopo di regolarne la loro immissione in ambiente confinato ad uso sperimentale ma anche sul mercato, attraverso una specifica procedura di autorizzazione (vedi direttiva 2001/18/CE). Nel nostro Paese la normativa nazionale di riferimento è stata aggiornata con la pubblicazione nella G.U.R.I. del Decreto Legislativo nr. 224 in data 8 luglio 2003 (che ha recepito la dir. 2001/18/CE). Il D.L. No. 224 è stato poi completato dal recente D.L. No. 5 (28/01/05), predisposto dal ministero dell'Agricoltura, che tende a garantire una possibile coesistenza tra coltivazioni GM e i sistemi di coltivazione tradizionali, rispetto alla quale le singole Regioni sono tenute, entro Giugno 2006, ad aderire con la presentazione di un loro piano di coesistenza che deve prevedere, in primo luogo, l'identificazione di siti pubblici ufficiali dove poter attivare la sperimentazione.

Il provvedimento normativo comunitario ed il corrispondente recepimento nazionale si articola in quattro parti: la *parte A* contiene le disposizioni principali, quella *B* regola l'immissione nell'ambiente - a scopi sperimentali - di organismi geneticamente modificati, la successiva *parte C* disciplina la relativa immissione in commercio, conseguente ad una decisione comunitaria, infine nella *parte D* sono contemplate le disposizioni finali, poi integrate con la richiesta per ogni notifica di specifici piani di sicurezza e di monitoraggio.

La normativa nazionale non ha il solo scopo di proteggere la salute umana e l'ambiente dai potenziali rischi in caso di emissione sperimentale o immissione sul mercato di organismi transgenici, ma, quale elemento di novità non direttamente contemplato nella Direttiva 2001/18/CE, di tutelare l'agrobiodiversità, i prodotti tipici, biologici e di qualità. Inoltre, rispetto alla normativa nazionale di attuazione della precedente Direttiva, l'Autorità competente cui è affidata la gestione del settore transgenico passa dal Ministero della Salute (a cui resta la competenza sui microrganismi transgenici) a quello dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, che coordina la Commissione Interministeriale di Valutazione (CIV) e che si identifica come l'organo tecnico che deve elaborare i pareri sulle notifiche (tipo B – sperimentazione e tipo C commercializzazione).

Le notifiche per la sperimentazione di piante GM, che vengono valutate dalla CIV, devono essere finalizzate ad una completa valutazione agronomica delle caratteristiche delle piante geneticamente modificate, non solo per i possibili rischi, ma soprattutto per i possibili benefici che possono derivare dalla coltivazione dei nuovi genotipi modificati per singoli geni che possono determinare importanti miglioramenti quantitativi e qualitativi della produzione. Il recepimento della normativa comunitaria è avvenuto nel 2003, ma al 2012 non si è ancora giunti alla applicazione utile per avviare nuove sperimentazioni su piante GM in Italia, perché ancora non è stato trovato un accordo tra Ministero

Agricoltura e Conferenze Stato e Regioni sui protocolli da adottare per garantire una maggiore sicurezza nella realizzazione delle sperimentazioni.

### **Prospettive**

La trasformazione genetica è tra le tecniche biotecnologiche a supporto del miglioramento genetico quella che presenta le più elevate potenzialità sia perché consente di superare molti dei limiti che si incontrano operando con i metodi tradizionali di miglioramento genetico sia perché i tempi di realizzazione degli stessi programmi si riducono fortemente.

Dal 1998 in Italia come in Europa a causa delle varie decisioni politiche, il numero delle notifiche di sperimentazioni in campo di piante GM ha subito una continua riduzione (Masciarelli et al., 2004) fino a limitarsi attualmente a soli due campi autorizzati, presso l'Università della Tuscia e presso l'Università Politecnica delle Marche e all'accettazione della richiesta di notifica da parte dell'Università di Catania. In generale, tale situazione è molto significativa del livello di carenza che si è creata nel nostro paese sulle conoscenze necessarie per una valutazione coerente, su base scientifica, dei possibili rischi, benefici e della reale utilità delle piante GM per la nostra agricoltura. A tale situazione è corrisposto un indebolimento nel sistema di valutazione e soprattutto di acquisizione e trasferimento delle competenze necessarie per l'applicazione corretta, competitiva e mirata alle esigenze della nostra agricoltura delle tecniche innovative di biologia molecolare e di ingegneria genetica.

In questo scenario scientifico abbastanza avvilente si può rilevare di positivo che, soprattutto a livello nazionale, la poca ricerca che è continuata si è concentrata particolarmente su diverse specie di interesse per le produzioni orto-floro-frutticole (Masciarelli et al., 2004). I risultati rilevabili per le piante da frutto, in particolare, possono essere presi ad esempio su come queste tecniche molecolari devono essere considerate come validi strumenti integrativi al 'breeding' tradizionale e su come deve essere affrontata una ricerca che comprende la produzione e sperimentazione su piante GM.

L'accettabilità futura di piante e prodotti GM dipende solamente dalla continuità della ricerca che deve operare per migliorare le tecniche di trasformazione genetica, per individuare e sperimentare geni di interesse connessi alla risoluzione di problematiche specifiche dei nostri sistemi produttivi con la completa assenza di rischi per l'uomo e per l'ambiente. Tale aspetto è particolarmente importante per le specie arboree da frutto se si considerano la notevole complessità fisiologica della pianta e il lungo ciclo delle coltivazioni, fattori che rendono più complessi i problemi connessi alla stabilità dell'espressione del transgene.

L'unico esempio di diffusione commerciale di pianta da frutto GM è la papaya resistente a virus, avanzata è anche la richiesta di autorizzazione commerciale per il susino resistente a Sharka, e particolare attenzione sembra essere indirizzata a meli transgenici resistenti a patogeni ottenuti grazie all'introduzione di geni isolati dalla stessa specie (cisgenici). In un prossimo futuro la

disponibilità di nuovo materiale ottenuto con questa tecnologia è destinato ad aumentare enormemente, grazie in particolare alle conoscenze derivanti dal sequenziamento del genoma di molte specie, tra cui vite, melo e pesco, già disponibili, olivo e clementine di prossima realizzazione, ed anche allo sviluppo di nuove tecnologie utili per migliorare l'efficienza e il controllo degli eventi di ingegneria genetica.

### **Bibliografia**

- Baulcombe DC (1999). Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 109-113.
- Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431:356–363.
- Bardonnier, N., Hans, F., Serghini, M.A. And Pinck, L (1994). Protection against virus infection in tobacco plants expressing the coat protein of grapevine fanleaf nepovirus. *Plant Cell Re.* 13, 357-360.
- Costantini E., L. Landi, Silvestroni O., Pandolfini P., Spena A. and Mezzetti B. (2007). Auxin Synthesis-Encoding Transgene Enhances Grape Fecundity. *Plant Physiology*, Vol. 143, pp. 1689–1694.
- Flavell RB (1994) Inactivation of gene expression in plants as a consequence of specific sequence duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3490–3496.
- Fuchs M, (2003). Transgenic resistance: state of the art and perspectives. Extended abstracts of the 14th Meeting of ICVG, Locorotondo, 2003: 221-223.
- Fuchs M and Gonsalves D (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu. Rev. Phytopathol* 45:173 – 202.
- Fuchs M and Gonsalves D (2007). Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annu. Rev. Phytopathol* 45:173 – 202.
- Gambino G., Perrone I., Carra A., Chitarra W., Boccacci P., Torello Marinoni D., Barberis M., Maghuly F., Laimer M., Gribaudo I. (2010). Transgene silencing in grapevines transformed with GFLV resistance genes: analysis of variable expression of transgene, siRNAs production and cytosine methylation. *Transgenic Res* 19:17–27.
- Jamoussi RJ., Winterhagen P., Bouamama B., Dubois C., Mliki A., Wetzel T., Ghorbel A., Reustle G (2009). Development and evaluation of a GFLV inverted repeat construct for genetic transformation of grapevine. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 97:187–196.
- Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* Vol 144.
- Kortekamp A. (2006). Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 58-67.

- Maghuly F., Leopold S., Machado A.D.C., Fernandez E.B., Khan M.A., Gambino G., Gribaudo I., Schartl A., Laimer M., (2006). Molecular characterization of grapevine plants transformed with GFLV resistance genes: II. *Plant Cell Reports* 25: 546-553.
- Mezzetti B., Pandolfini T., Navacchi O., Landi L., (2002). Genetic transformation of *Vitis vinifera* via Organogenesis. *BMC Biotechnology* 2:18.
- Palma D., Girolomini L., Pandolfini T., Navacchi O. and Mezzetti B. (2010). “Regeneration and Genetic transformation via- Organogenesis of diferent varietie of *Vitis vinifera* and *Prunus persica*” IHC, Lisboa.
- Perl A. and Eshdat Y., (1998). DNA transfer and gene expression in transgenic grapes. In: Tombs, M.P. (ed). *Biotechnology and genetic engineering reviews* vol. 15. Intercept Ltd. Andover, pp. 365-389.
- Perl A., Sahar N., Farchi S.H., Colova-Tsolova V., Holland D. and Golop R., (2000). Conventional and biotechnological breeding of seedless table grapes in Israel. 6<sup>th</sup> International symposium on Grapevine Physiology and Biotechnology, Greece.
- Tesniere C., Torregrosa L., Pradal M., Souquet J.M., Gilles C., Dos Santos K., Chatelet P., and Ziya Gunata (2006). Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, No. 1, pp. 91–99.
- Vivier, M.A, Becker, J., Carstens, M., De Ascensao, A., De Beer, A., Marais, E. and Pretorius, I.S., (2000). Engineering fungal resistance in grapevine (*Vitis vinifera*). 6<sup>th</sup> International Symposium on Grapevine Physiology and Botechnology Greece.
- Zamore P.D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science* Vol. 296, 1265-1269.