

La resistenza transgenica indotta dal patogeno: un'applicazione biotecnologica poco utilizzata

INTRODUZIONE

Secondo le più recenti stime dell'organizzazione internazionale ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, USA), una superficie cumulativa di oltre 1,8 miliardi di ettari (ha) è stata investita nel mondo a colture geneticamente modificate (GM) a partire dal 1996, anno che ha visto la nascita dei primi impianti commerciali. Da allora, tra i 160 e i 180 milioni di ha vengono annualmente destinati nel mondo a questo tipo di coltivazioni, con un incremento annuo di circa il 4% rispetto agli 1,7 milioni di ha del 1996. Nel 2014, 28 diversi Paesi, equamente distribuiti tra industrializzati e in via di sviluppo, hanno adottato colture GM e, nello stesso anno, 18 milioni di agricoltori (7,1 milioni in Cina e 7,7 milioni in India) il 96% dei quali costituiti da piccoli proprietari, hanno coltivato oltre 15 milioni di ha di cotone Bt, mentre 415 mila piccoli coltivatori filippini hanno allevato mais GM.

Tra i Paesi in cui le coltivazioni GM sono liberalizzate, gli Stati Uniti sono in testa con oltre 73 milioni di ha, che forniscono il 93% del mais, il 94% della soia e il 96% del cotone prodotti nel Paese; il Brasile segue dappresso con 40 milioni di ha tra mais, soia e cotone (il 98% della soia prodotta è transgenica); l'Argentina è al terzo posto con 24 milioni di ha tra mais, soia e cotone (la totalità della soia è GM); l'India è quarta con 12 milioni ha di cotone Bt che costituiscono il 95% della coltura globale; il Canada è al quinto posto con 12 milioni ha di colza GM, pari al 95% della coltura globale, e coltiva anche mais e soia GM.

* Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università di Bari Aldo Moro

** Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante, Consiglio Nazionale delle Ricerche, UOS Bari

Questi imponenti dati danno la misura di quanto le biotecnologie abbiano influenzato l'agricoltura mondiale, e come ci si possa ragionevolmente attendere un'ulteriore espansione delle piante GM, sia nei Paesi che già le adottano, che in quelli che ne stanno considerando l'utilizzazione. Infatti, vi è già una lista di oltre 70 nuovi prodotti GM che attendono l'approvazione per entrare nel circuito commerciale (James, 2014).

E la vecchia Europa? Non è improbabile che anch'essa capitolì, ancorché nei tempi non brevi, seguendo l'esempio dei pochi membri UE (Spagna, Portogallo, Repubblica Ceca, Romania, Slovacchia) che hanno "coraggiosamente" iniziato la coltivazione di mais transgenico nel loro territorio (James, 2014), e facendo mente locale alla marchiana incongruenza comunitaria, che permette l'importazione di fibre GM (cotone) e prodotti GM (mais, soia, colza) per uso alimentare umano e animale (le importazioni annue della sola soia ammontano a circa 40 milioni di tonnellate) ma non la coltivazione delle piante che li producono.

COLTURE GM: UNA BREVE SINTESI

Da quanto sopra, emerge che le colture GM che attualmente la fanno da padrone sono soia, mais e cotone. La prima resiste ad alcuni erbicidi (glifosate, imidazolinone), le altre due a insetti: piralide e diabrotica (mais), *Helicoverpa armigera* (cotone).

Assai meno frequenti sono le piante ingegnerizzate per la resistenza alle malattie fungine e batteriche. Un elenco relativamente recente di queste (patata, mais, soia, girasole, pioppo, frumento, orzo, riso, tabacco, cotone, pomodoro), dei geni usati per la trasformazione e dei patogeni cui è stata introdotta resistenza è riportato da Collings et al. (2008). Tuttavia questi risultati sperimentali, ancorché promettenti, non hanno ancora dato vita a prodotti commerciali (Anonimo, 2015).

Più incoraggiante, anche per i risultati pratici già conseguiti, è la situazione delle piante GM trasformate per la resistenza ai virus.

Contro questi patogeni non si può contare sulla lotta chimica e gli interventi biologici (protezione incrociata), sperimentati con qualche successo in un recente passato (Zhou e Zhou, 2012) per alcune colture (cacao, papaia, pomodoro, zucchini, agrumi), sono ormai caduti in disuso, eccetto che per la protezione dal ceppo "stem pitting" del virus della tristezza degli agrumi (Roistacher et al., 2010). Ciò rende obbligato il ricorso al miglioramento genetico. Quello tradizionale (reperimento di geni di resistenza in specie

sessualmente compatibili con la coltura da migliorare e loro trasferimento con l'incrocio) è utilizzabile ogniqualvolta esistano i presupposti per poterlo applicare (Gomez et al., 2009). E di ciò non mancano esempi di successo, come quelli, tanto per citarne un paio, relativi alla introgressione di resistenze durevoli ai virus A (PVA), M (PVM), S (PVS), X (PVX) e Y (PVY) (Foxy, 1992) in diverse cultivars di patata, e ai virus del mosaico del cetriolo (CMV), della maculatura anulare della papaia (PRSV), del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e della maculatura necrotica del melone (MNSV) nel melone (Blanchard et al., 1991). Tuttavia non è sempre facile trovare fonti di resistenza naturali efficaci o trasferibili nelle specie coltivate da quelle selvatiche che li possiedono. Per superare questa impasse ci si può rivolgere all'uso della "resistenza derivata da patogeno" (pathogen-derived resistance, PDR), un'applicazione biotecnologica basata sul DNA ricombinante, che ha visto la luce una trentina di anni addietro (Sanford e Johnston, 1985) aprendo la via alla resistenza transgenica che rappresenta il più avanzato esempio di resistenza non convenzionale, la cui prima dimostrazione sperimentale va accreditata a Powell-Abel et al. (1986).

Le resistenza transgenica ai virus si esplica attraverso due principali meccanismi denominati "resistenza indotta da proteine" (protein-mediated resistance) e "resistenza indotta da acido ribonucleico" (RNA-mediated resistance).

La prima modalità di protezione è stata accertata in piante trasformate con la proteina capsidica (CP) di alcune entità infettive, tra cui gli agenti del mosaico del tabacco (TMV), del mosaico dell'erba medica (AMV), nonché il virus X della patata (PVX). In questi casi, la resistenza è proporzionale alla quantità di CP virale espressa dalla pianta transgenica ed è superata dalla inoculazione della pianta trasformata con RNA virale totalmente o parzialmente nudo. Si ritiene che il meccanismo che sottende a questo tipo di resistenza sia in qualche modo collegato all'interferenza con la decapsidazione del virus, il cui RNA diventa indisponibile per l'aggancio dei ribosomi e per le susseguenti fasi replicative (Prins et al., 2008).

Il secondo meccanismo, noto come "silenzamento genico post trascrizionale" (PTGS) comporta l'inattivazione dell'RNA genomico virale attraverso un processo degradativo sequenza-specifico. Il PTGS non è un sistema immunitario, ancorché abbia tre caratteristiche in comune con quello dei vertebrati: (i) specificità verso elementi invasori estranei (acidi nucleici nel caso del PTGS); (ii) capacità di sviluppare e amplificare una massiccia risposta contro di essi; (iii) capacità di diffondersi sistemicamente nell'ospite.

La provata efficacia del PTGS non sembra essere condizionata dai geni

virali usati per la trasformazione. Tra questi, i più largamente utilizzati sono quelli che esprimono le proteine capsidiche, replicasiche, di movimento e, con minore frequenza, proteine non strutturali di diversi tipi quali, ad esempio, i geni Rep dei geminivirus e le proteasi NI, proteina P1 e HCPro dei potyvirus. L'adeguatezza di questi transgeni nella induzione di resistenza è stata ampiamente dimostrata mediante la trasformazione di tabacchi (*Nicotiana tabacum* e *N. benthamiana* in particolare) con sequenze geniche di oltre 50 diversi fitovirus, per lo più a RNA, appartenenti a una vasta gamma di raggruppamenti tassonomici (famiglie) con differenti comportamenti epidemiologici (Cillo e Palukaitis, 2014).

Poiché oggetto di trasformazione sperimentale sono state anche piante agrarie di importanza economica (si veda tra gli altri Fuchs et al., 2007), ci si sarebbe atteso che l'imponente sperimentazione condotta nell'ultimo ventennio sfociasse nella produzione e adozione commerciale di piante GM resistenti ai virus. Non è stato così, se non in un numero limitato di casi.

Tra questi, il maggiore successo ha arriso alle papaie (*Carica papaya*) GM trasformate per la resistenza al potyvirus della maculatura anulare (PRSV), che nelle Hawaii ne hanno rimesso in piedi la coltura che era stata praticamente distrutta dal virus in questione (Gonsalves, 1988; Gonsalves et al., 2004), e che si stanno aprendo il varco anche altrove. Altri esempi sono costituiti da: (i) una zucca (crookneck squash) trasformata per la resistenza ai potyvirus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e del mosaico 2 dell'anguria (WMV-2) (Fuchs e Gonsalves, 1995), coltivata negli USA (Tricoli et al., 1995); (ii) il susino 'Honey sweet' resistente al virus della vaiolatura (PPV), sviluppato in Europa (Ravelonandro et al., 1997; 2013) ma ammeso alla coltivazione negli USA; (iii) il fagiolo "EMBRAPA 5.1", resistente al begomovirus del mosaico dorato del fagiolo (BGMV), ottenuto di recente in Brasile (Faria et al., 2014). Assai poco in rapporto al molto lavoro sperimentale effettuato nel mondo (Europa inclusa).

Queste scarse ricadute pratiche sembrano dovute non già alla inefficacia dell'approccio transgenico che, quando ha avuto la possibilità di un riscontro di campo ha finora dimostrato indubbia validità, ma piuttosto alla perdurante ostilità verso le piante GM che ha scoraggiato le ricerca pubblica, che pure qualche successo l'ha conseguito (Fuchs e Gonsalves, 1995; Gonsalves et al., 2004; Ravelonadro et al., 1997).

È sperabile che quanto di seguito riportato contribuisca a contenere la sfiducia dei consumatori nei riguardi della sicurezza degli alimenti di origine GM?

I TRANSGENI NATURALI

Nel genoma della vite cv. Pinot noir, interamente sequenziato di recente, è stata riscontrata la presenza di frammenti nucleotidici di 200-800 basi appartenenti a diversi “pararetrovirus” della famiglia *Caulimoviridae* (Bertsch et al., 2009). Un reperto, questo, né nuovo né sorprendente, poiché analoghe inserzioni genomiche di origine virale erano state rilevate oltre una decina di anni addietro in altre specie vegetali quali, ad esempio, pomodoro, patata, petunia, tabacchi (*Nicotiana* spp.), orzo e banana (Harper et al., 2002).

I “pararetrovirus” sono virus a DNA, agenti di malattie di rilevanza economica, che infettano in natura un’ampia gamma di piante agrarie e non. Essi sono stati così denominati per distinguerli dai “retrovirus” dei vertebrati, che hanno genoma a RNA e che annoverano temibili rappresentanti quali, ad esempio, il virus dell’immunodeficienza umana (HIV), responsabile dell’AIDS (sindrome da immunodeficienza acquisita).

A parte le differenze nella morfologia delle particelle e nei meccanismi di diffusione naturale (epidemiologia), ciò che distingue i due tipi di virus è, come si è accennato, il diverso tipo di acido nucleico che ne costituisce il patrimonio genetico (RNA o DNA). Ciò che invece li accomuna è: (i) l’intervento nel loro ciclo replicativo di un enzima noto come trascrittasi inversa (o retrotrascrittasi, da cui la denominazione degli agenti infettivi che la posseggono), in grado di sintetizzare molecole di DNA da uno stampo di RNA; (ii) la capacità di integrarsi nel genoma dell’ospite a seguito di ricombinazione genica (trasferimento orizzontale).

Ma anche quest’ultima caratteristica è fonte di differenziazione poiché, mentre nei vertebrati è l’intero genoma virale che si disloca in quello della cellula ospite trasformandola, ciò avviene più di rado nei vegetali, nei quali si conoscono solo tre esempi (banana, petunia e tabacco) di integrazione di un genoma pararetrovirale completo (Staginnus and Richert-Poggeler, 2006). Questi eventi sfociano nella “nascita” di veri e propri virus endogeni che si trasmettono alla progenie (trasferimento verticale) e che di norma sono silenti, ma in grado di attivarsi a seguito di stress (ferita, estremi termici, siccità, modifica del fotoperiodo), dando origine a malattie analoghe a quelle prodotte da infezioni esogene.

Sin qui la similitudine, anche comportamentale, tra virus retroidi degli animali e delle piante. In queste ultime, tuttavia, è stata più di frequente riscontrata la presenza non di interi genomi virali (come nella vite, ad esempio), bensì di loro frammenti, costituiti da sequenze nucleotidiche ripetute che si integrano in loci diversi dei loro cromosomi.

Sembra evidente che queste incomplete inserzioni esogene non possano generare malattie. Ci si è pertanto chiesti se esse abbiano un qualche significato per la pianta che li ospita, e quali funzioni eventualmente svolgano. Una possibile risposta la si è trovata in quanto già detto sul meccanismo che sottende alla “resistenza indotta dal patogeno” che si scatena nelle piante GM trasformate con geni virali. È plausibile infatti che le sequenze pararetrovirali endogene rappresentino dei veri e propri “transgeni naturali” i cui RNA verrebbero individuati dalle cellule ospiti come invasori, mettendo così in moto il sistema di silenziamento genico della pianta, a protezione dall’infezione di virus esogeni dello stesso tipo. E che i “transgeni naturali” non siano una “rara avis”, trova conferma nella recente individuazione di inserti di sequenze di *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes* in numerosi genotipi (45 su 217) di patate dolci (*Ipomea batata*) coltivate e selvatiche (Kyndt et al., 2015).

La morale di questa storia è che l’inserimento di geni virali nel genoma delle piante, che determina sviluppo di resistenza alle infezioni da virus omologhi, è un fenomeno naturale che si ritiene abbia preso corpo nel corso del processo co-evolutivo ospite-virus. L’uomo, pertanto, con le recenti applicazioni biotecnologiche (ingegneria genetica), non ha fatto altro che imitare quanto la natura aveva già da lungo tempo messo in opera. E questo, con buona pace di coloro che avversano l’uso dell’ingegneria genetica in agricoltura, ritenendola una manipolazione pericolosa per la salute, nonché innaturale ed eticamente riprovevole.

CISGENESI CONTRO TRANSGENESI

La “cisgenesi” è una forma di ingegneria genetica che prevede il trasferimento artificiale di singoli geni tra organismi incrociabili della stessa specie o tra organismi strettamente correlati ma non necessariamente incrociabili tra loro. A essa ci si riferisce come “intragenesi” quando si utilizzano geni ibridi che possiedono elementi genetici derivanti da geni e loci differenti. Questi approcci riducono di molto i tempi richiesti dal miglioramento genetico tradizionale basato su incrocio e reincrocio (Jacobsen e Schouten, 2007).

Pertanto, a differenza dalla “transgenesi”, la cisgenesi non utilizza geni derivati da organismi biologicamente assai distanti tra loro (ad es. virus, batteri e altri microrganismi, mammiferi) ed estranei alle piante per l’introduzione in queste ultime.

Recenti esempi di cisgenesi coronata da successo sono le piante di melo (cv. Gala) che il trasferimento del gene *HcrVf2* da *Malus floribunda* ha reso resistenti alla ticchiolatura (*Venturia inaequalis*) (Belfanti et al., 2004; Vanblaere et al., 2011) e tre differenti cultivars di patata, in cui è stata introdotta una coppia di geni da *Solanum stoloniferum* e *S. venturii* per la resistenza alla peronospora (*Phytophthora infestans*) (Jo et al., 2014).

L'adozione nella UE delle patate cisgeniche potrebbe contribuire a un forte abbattimento delle perdite annualmente inflitte dalla peronospora, valutate in oltre un miliardo di € sui 6 miliardi di € del valore commerciale della produzione (Havenkort et al., 2008). Resta però da vedere sia quale sarà l'atteggiamento della UE che, in base alla direttiva 2001/18/EC sulle colture GM non fa distinzione tra transgeni e cisgeni, sia il grado di accettazione dei prodotti cisgenici da parte dei consumatori che, come già detto, sono per larga parte fortemente avversi alle odierne piante GM.

RIASSUNTO

Tra le molteplici applicazioni pratiche della transgenesi, vi è il suo uso per l'induzione di resistenza ai virus mediata da geni virali ("pathogen-derived resistance", resistenza derivata dal patogeno). A tutt'oggi sono state sperimentalmente trasformate molte specie vegetali per la resistenza a una cinquantina di virus diversi ma solo due di esse vengono per il momento coltivate commercialmente su scala relativamente ampia: una varietà di papaia trasformata con la CP del virus della maculatura anulare (PRSV) negli USA e in estremo oriente (Taiwan, Cina, Thailandia) e una zucca resistente al virus del mosaico giallo dello zucchini (ZYMV) e al virus 2 del mosaico dell'anguria (WMV-2) negli USA. Il susino 'Honey sweet' resistente al virus della vaiolatura dei Prunus (PPV) e un fagiolo resistente al virus del mosaico dorato (BGMV) sono stati approvati per la coltivazione negli USA e in Brasile, rispettivamente. Assai più successo hanno avuto le coltivazioni transgeniche di cinque specie vegetali resistenti a insetti (mais e cotone) o erbicidi (soia, colza, erba medica), che rappresentano la quasi totalità delle piante GM in coltura nel mondo. Nel 2014, 28 diversi Paesi equamente distribuiti tra "industrializzati" e "in via di sviluppo" hanno investito larghissime superfici (circa 180 milioni di ettari) a colture GM. Solo cinque di questi sono europei (Spagna, Portogallo, Repubblica Ceca, Romania, Slovacchia) e coltivano modeste superfici di mais GM. La contrarietà all'uso della trasformazione genetica ritenuta una manipolazione pericolosa per la salute, nonché innaturale ed eticamente riprovevole è ampiamente diffusa in Europa e difficilmente sarà scalfita dalla consapevolezza dall'accertata esistenza di piante transgeniche naturali e dalla possibilità di ricorrere alla cisgenesi, una forma di ingegneria genetica che prevede il trasferimento artificiale di singoli geni tra piante della stessa specie, così come avviene nel totalmente accettato, ma assai più lungo percorso del miglioramento genetico tradizionale.

ABSTRACT

One of the many practical applications of transgenesis encompasses the introduction into plants of resistance to viruses mediated by viral genes ("pathogen-derived resistance"). A wide number of plant species has currently been transformed for resistance to more than 50 different viruses belonging to diverse families. However, only two transgenic plant species are grown commercially on a relatively large scale: (i) a papaya cultivar transformed with the coat protein gene of *Papaya ringspot virus* (PRSV) in the USA and the far east (Taiwan, China, Thailand); (ii) a crookneck squash resistant to *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and to *Watermelon mosaic virus 2* (WMV-2) in the USA. The plum cv. Honey sweet resistant to *Plum pox virus* (PPV) and a french bean cultivar resistant to *Bean golden mosaic virus* (BGMV) have been deregulated in the USA and Brazil, respectively, and are ready for marketing. Much more successful have been the transgenic crops of five plant species that resist to insects (maize and cotton) or to herbicides (soybean, canola, alfalfa), which constitute the largest part of GM plants being cropped in the world. In 2014, 28 different countries, equally distributed among the "industrialized" and the "developing" ones, have invested huge surfaces (ca. 180 million hectares) to GM crops growing. Only five of these countries are from Europe (Spain, Portugal, Czech Republic, Romania, Slovakia), giving over to GM maize relatively small surfaces. The widespread antagonism to the use of genetic transformation, which in Europe is regarded as an ethically reproachable and unsafe practice, is unlikely to be placated by the scientifically established existence of naturally transgenic plants nor by the possibility of resorting to the use of cisgenesis, i.e. the transfer of single genes between plants of the same species, as it happens with the unconditionally accepted but much longer course of traditional crossing.

BIBLIOGRAFIA

- ANONIMO (2015): GMO Compass: www.gmo-compass.org.
- BELFANTI E., SILFVERBERG-DILWORTH E., TARTARINI S., PATOCCHI A., BARBIERI M., ZHU J., VINATZER B.A., GIANFRANCESCO L., GESSLER C., SANSAVINI S. (2004): *The HcrVf2 gene, from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety*, «Proceedings National Academy of Sciences USA», 101, pp. 886-890.
- BERTSCH C., BEUVE M., DOLJA V.V., WIRTH M., PELS F., HERRBACH E., LEMAIRE O. (2009): *Retention of the virus-derived sequences in the nuclear genome of grapevine as a potential pathway to virus resistance*, «Biology Direct», 4, pp. 21-32.
- BLANCHARD D., LECOCQ H., PITRAT M. (1991): *Maladies des Cucurbitacées. Observer, Identifié, Lutter*, Editions INRA, Paris France.
- CILLO F., PALUKAITIS P. (2014): *Transgenic resistance*, «Advances in Virus Research», 90, pp. 35-146.
- COLLINGS D.B., LUND O.S., THORDAL-CHRISTENSEN H. (2008): *What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants?*, «European Journal of Plant Pathology», 121, pp. 217-231.
- FARIA J.C., VALDISSER P.A.M.R., NOGUEIRA E.O.P.L., ARAGAO F.J.L. (2014): *RNAi-based Bean golden mosaic virus-resistant common bean (Embrapa 5.1) shows simple inheritance for both transgene and disease resistance*, «Plant Breeding», 133, pp. 649-653.
- FOX E.M. (1992): *Breeding for viral resistance: conventional methods*, «European Journal of Plant Pathology», 98, pp. 13-20.

- FUCHS M., GONSALVES D. (1995): *Resistance of transgenic squash Pavo ZW-20 expressing the coat protein genes of Zucchini yellow mosaic virus and Watermelon mosaic virus 2 to mixed infections by both potyviruses*, «Nature Biotechnology», 13, pp. 1466-1473.
- FUCHS M., CAMBRA M., CAPOTE N., JELKMANN W., KUNDU J., LAVAL V., MARTELLI G.P., MINAFRA A., PETROVIC N., PFEIFFER P., POMPE-NOVAK M., RAVELONANDRO R., SILDARELLI P., STUSSI-GARAUD C., VIGNE E., ZAGRAI I. (2007): *Safety assessment of transgenic plums and grapevines expressing viral coat protein genes: new insight into real environmental impact of perennial plants engineered for virus resistance*, «Journal of Plant Pathology», 89, pp. 2-12.
- GOMEZ P., RODRIGUEZ-HERNANDEZ A.M., MOURY B., ARANDA M.A. (2009): *Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability*, «European Journal of Plant Pathology», 125, pp. 1-22.
- GONSALVES D. (1998): *Control of papaya ringspot virus in papaya: A case study*, «Annual Review of Phytopathology», 36, pp. 415-437.
- GONSALVES D., GONSALVES C., FERREIRA S., PITS K., FITCH M., MANSHARDT R., SLIGHTOM J. (2004): *Transgenic virus resistant papaya: from hope to reality for controlling Papaya ringspot virus in Hawaii*, APSnet Features. Online. doi:10.1094/APSnetFeature-2004-0704
- HARPER G., HULL R., LOCKHART B., OLSZEWSKI N. (2002): *Viral sequences integrated into plant genomes*, «Annual Review of Phytopathology», 40, pp. 119-136.
- HAVERKORT A.J., BOONEKAMP P.M., HUTTEN R., JACOBSEN E., LOTZ L.A.P., KESSEL G.J.T., VISSER R.G.F., VAN DER VOSSEN E.A.G. (2008): *Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification*, «Potato Research», 51, pp. 47-57.
- JACOBSEN E., SCHOUTEN H.J. (2007): *Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants*, «Trends in Biotechnology», 25, pp. 219-223.
- JAMES C. (2014): *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2014*, ISAAA Brief No 46. ISAAA, Ithaca, NY, USA.
- JO K.R., KIM C.J., KIM S.J., KIM T.Y., BERGERVOET M., JONGSMA M.A., VISSER R.G.F., JACOBSEN E., VOSSEN J.H. (2014): *Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking*, «MBC Biotechnology», 14, pp. 50-60.
- KYNDT T., QUISPE D., ZHAI H., JARRET R., GHISLAIN M., LIU Q., GHEYSEN G., KREUZE J.F. (2015): *The genome of cultivated sweet potato contains Agrobacterium T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop*, «Proceedings National Academy of Sciences USA», 112, pp. 5844-5649.
- POWELL ABEL P., NELSON R.S., DE B., HOFFMANN N., ROGERS S.G., FRALEY R.T., BEACHY R.N. (1986): *Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene*, «Science», 232, pp. 738-743.
- PRINS M., LAIMER M., NORIS E., SCHUBERT J., WASENEGGER M., TEPPER M. (2008): *Strategies for antiviral resistance in transgenic plants*, «Molecular Plant Pathology», 9, pp. 73-83.
- 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, pp. 1231-1235.
- RAVELONANDRO M., SCORZA R., POLAK J., CALLAHAN A.M., KRŠKA B., KUNDU J., BRIARD P. (2013): *"Honey sweet" plum - a valuable genetically engineered fruit tree cultivar*, «Food and Nutrition Sciences», 4, pp. 45-49.

- ROISTACHER C.N., DA GRACA J.V., MULLER G.W. (2010): *Cross protection against Citrus tristeza virus - a review*, Proceedings 17th Conference IOCV, Adana, Turkey, pp. 1-27.
- SANFORD J.C., JOHNSTON S.A. (1985): *The concept of parasite-derived resistance. Deriving resistance genes from the parasite's own genome*, «Journal of Theoretical Biology», 113, pp. 395-405.
- STAGINNUS C., RICHERT-PÖGGELER K.R. (2006): *Endogenous pararetroviruses: two-faced travelers in the plant genome*, «Trends in Plant Science», 25, pp. 219-223.
- TRICOLI D., CARNEY K., RUSSELL P., MCMASTER J., GROFF D., HADDEN K., HIMMEL P., HUBBARD J., BOESHORE M., REYNOLDS J., QUEMADA H. (1995): *Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus, Watermelon mosaic virus 2, and Zucchini yellow mosaic virus*, «Nature Biotechnology», 13, pp. 1458-1465.
- VANBLAERE T., SZANKOWSKI I., SCHAARTB J., SCHOUTEN H., FLACHOWSKY H., BROGINI A.L.G., GESSLER C. (2011): *The development of a cisgenic apple plant*, «Journal of Biotechnology», 154, pp. 304-311.
- ZHOU C., ZHOU Y. (2012): *Strategies for viral cross protection in plants*, «Methods in Molecular Biology», 894, pp. 69-81.