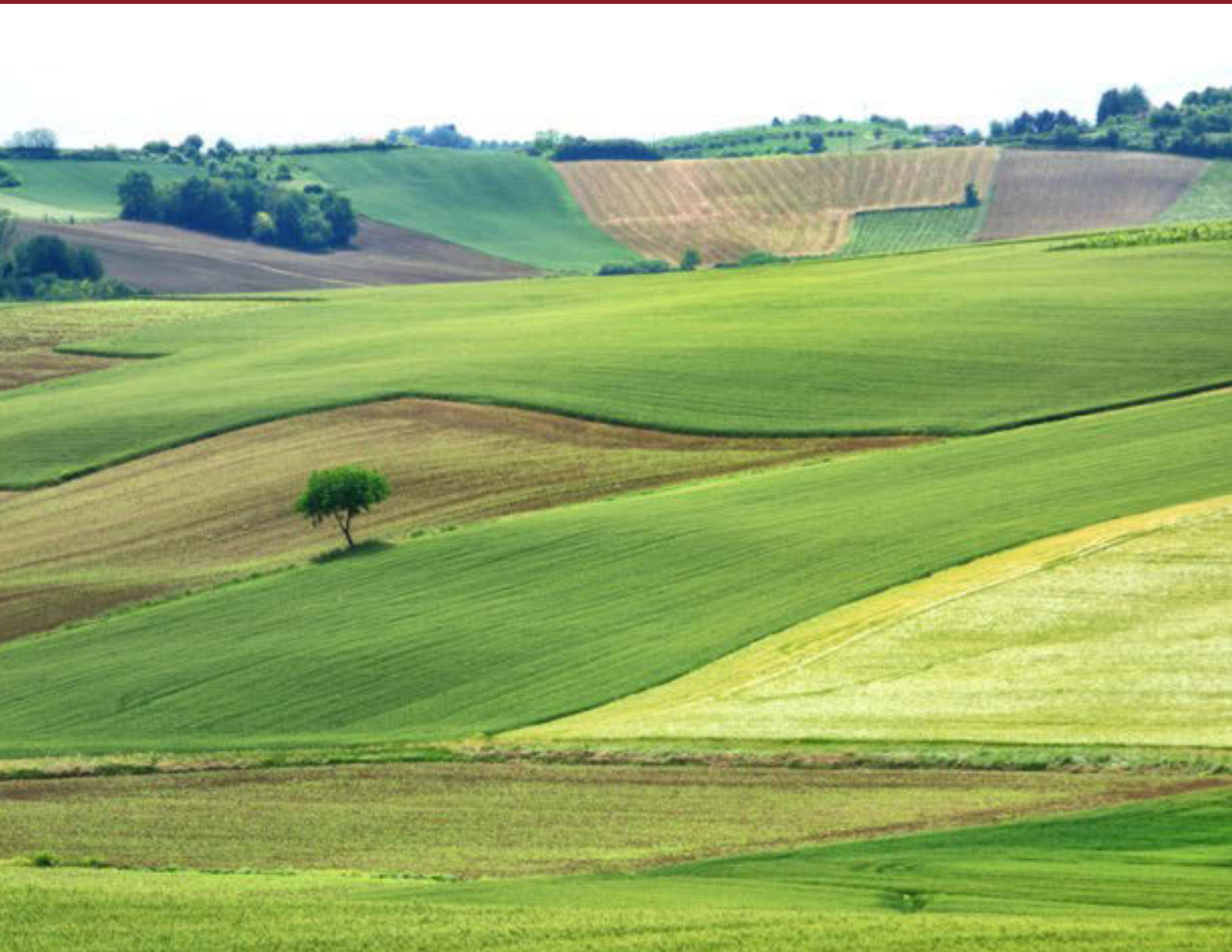




In questo numero: La ricerca genetica applicata allo sviluppo varietale



15

Le conoscenze genomiche stanno cambiando il miglioramento genetico del frumento



27

Marcatori molecolari e protocolli di analisi varietale delle sementi: nuovi sviluppi



43

L'applicazione delle moderne tecnologie genomiche al miglioramento genetico



21

Ibridi di orzo: problematiche e realizzazioni



36

Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico



51

Un piano per lo sviluppo di biotecnologie sostenibili sulle principali colture italiane

Questa volta parliamo di noi

Alla vigilia dell'ennesima riorganizzazione istituzionale che la certificazione delle sementi subisce, vogliamo ribadire il ruolo fondamentale che l'attività riveste nel contesto dell'agricoltura italiana e dell'innovazione cui è dedicato questo numero di *dal Seme*.

Concetti più volte affermati che tanti condividono nel principio ma che al momento delle decisioni importanti non ottengono l'attenzione dovuta.

Sembra banale dirlo, ma l'innovazione ha senso quando giunge nelle aziende agricole e risolve un problema o induce un miglioramento che l'agricoltore possa percepire. Le sementi rappresentano il vettore attraverso il quale l'innovazione arriva in azienda con la propria carica di novità, le proprie caratteristiche genetiche e tecnologiche concentrate in una varietà e in un seme.

Produrre sementi richiede conoscenze multidisciplinari che passano dalla botanica all'agronomia, all'economia e perché no alla sociologia; ogni decisione anche politica che le riguarda deve tener presente questi fattori.

Si tratta di un'attività che non si può improvvisare e che richiede tempi tecnici lunghi e buona programmazione, ancor più se si parla di costituzione di nuove varietà che le metodiche richiamate in questo numero promettono di ridurre.

Per quante carenze strutturali e di non recente origine si caratterizzi il settore, soprattutto per la costituzione di nuove varietà, l'Italia è un paese di primaria importanza per la produzione e la commercializzazione di sementi certificate, almeno in un contesto europeo e per alcune specie e talune specialità può senza dubbio definirsi un paese guida.

Il settore muove un giro di affari annuo superiore al miliardo di euro e le ditte sementiere che operano sul territorio sono più di duecento, mentre sono almeno novemila gli agricoltori che si occupano della moltiplicazione in campo di sementi certificate. Riso, erba medica, frumento duro, barbabietola, ortive sono riconosciute eccellenze per settore sementiero italiano e alimentano una corrente di esportazione significativa. Ma le specie certificate in Italia sono più di ottanta.

In questo contesto si colloca la certificazione delle sementi, un controllo di qualità del prodotto e del processo

di produzione che tutela in primo luogo l'utilizzatore e che garantisce, da molto prima che la tracciabilità fosse un concetto diffuso, l'origine del seme.

In questo contesto si colloca oggi CREA-SCS, ieri ENSE, che da sessanta anni è al servizio dell'agricoltura italiana nel proprio ruolo di organo ufficiale cui la legge nazionale ha affidato il compito di dare applicazione alle norme internazionali e dell'Unione europea che regolano la commercializzazione delle sementi.

Un ruolo cui nel tempo non si è mai venuti meno, nonostante periodi di difficoltà coincidenti con le ri-organizzazioni, perché anche l'autorità di certificazione ha bisogno, come il settore per cui lavora, di stabilità e di programmazione.

Solo così si può far fronte a quasi duecentomila ettari da controllare e più di cinquecentomila tonnellate di sementi da certificare, a quindici milioni di etichette di certificazione da rilasciare a cinquantamila analisi di laboratorio e diecimila parcelle di post controllo da realizzare a ogni campagna. Per non dire di più di mille nuove varietà che ogni anno fanno parte della rete di prove per l'iscrizione al registro nazionale o per il rilascio del titolo di protezione comunitario delle varietà, di cui CREA-SCS ha il coordinamento.

Se ciò è stato possibile farlo e continua a essere fatto lo si deve soprattutto alla dedizione, alla professionalità, all'esperienza, alle capacità, a volte, l'abnegazione del personale che vi lavora, di più di duecento persone tra ricercatori, tecnici, operai agricoli, amministrativi, controllori esterni che rappresentano il vero motore dell'organizzazione, anche e soprattutto quelli a tempo determinato che fanno parte integrante della struttura e che hanno investito il loro futuro su questa attività.

Una base solida, motivata, organizzata che permette a molti ricercatori di CREA-SCS di rivestire ruoli di primissimo piano nelle organizzazioni internazionali di standardizzazione delle sementi e di esportare il modello organizzativo in molti paesi che nel tempo hanno chiesto la nostra collaborazione.

Questo e altro ancora è CREA-SCS.

Pier Giacomo Bianchi

Rubriche

- 04. Notizie
- 08. Produzioni e mercati
- 09. Dai laboratori
- 13. Normativa sulle sementi

Ricerca

- 15. Le conoscenze genomiche stanno cambiando il miglioramento genetico del frumento

D. Barabaschi, E. Mazzucotelli, S. Delbono,
F. Desiderio, L. Cattivelli

- 21. Ibridi di orzo: problematiche e realizzazioni

E. Noli, S. Conti

- 27. Marcatori molecolari e protocolli di analisi varietale delle sementi: nuovi sviluppi

L. Andreani, C. Delogu, R. Zecchinelli

Tecnologia

- 36. Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico

G. Barcaccia, M. Lucchin

- 43. L'applicazione delle moderne tecnologie genomiche al miglioramento genetico

A. Fricano, R. Battaglia, T. Cardi, L. Cattivelli

- 51. Un piano per lo sviluppo di biotecnologie sostenibili sulle principali colture italiane

Statistiche

- 53. Superficie di colture da seme nelle campagne dal 2011 al 2015

- 55. Quantitativi di sementi certificate 2011-2015

Direttore Responsabile
Pier Giacomo Bianchi
scs@crea.gov.it

Direttore Editoriale
Elena Astrua Testori
info.dalseme@gmail.com

Comitato Editoriale
Mario Falcinelli
Maria Grazia D'Egidio
Elisabetta Lupotto

Comitato di Redazione
Pier Giacomo Bianchi
Maria Losi

Proprietario
Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi
dell'economia agraria - Centro di Sperimentazione
e Certificazione delle Sementi

Via Po, 14 - 00198 Roma
Tel. +39 06 47836218
Fax +39 06 47836210

Foto Copertina
Luigi Tamborini

Prende il via in Italia lo standard di qualità ESTA per la concia delle sementi

Il progetto ESTA (European Seed Treatment Assurance), nato su iniziativa dell'Associazione sementiera europea (ESA) per migliorare la qualità e la sicurezza della concia del seme attraverso la certificazione degli impianti di lavorazione delle sementi, parte anche in Italia. Assosementi diventa il rappresentante nazionale e agente esclusivo di ESTA per il territorio italiano.

L'adesione ai protocolli ESTA obbliga le aziende sementiere a certificare la sicurezza e l'efficienza del processo di concia, con la verifica della corretta gestione del processo di lavorazione e il controllo del residuo finale di polveri presenti sul seme, che deve risultare inferiore a determinati valori per evitare problemi di esposizione e dispersione durante il trattamento del seme conciato e la semina.

Il protocollo ESTA copre tutto il processo di trattamento delle sementi, dallo stoccaggio dei concianti fino al confezionamento e alla gestione dei rifiuti ed è aperto ad ogni tipologia di seme. Gli audit sono eseguiti da enti di certificazione indipendenti e consentono alle aziende accreditate di utilizzare il logo ESTA sulle sementi confezionate a garanzia della qualità dei processi di lavorazione.

Già attivo in Germania, Francia, Regno Unito, Spagna e Polonia, oggi in Europa sono oltre settanta gli impianti accreditati per diverse specie tra cui mais, colza, girasole, cereali e alcune colture orticole.

“Lo standard ESTA è una grande risorsa, soprattutto alla luce delle nuove politiche sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari – dice una nota di Assosementi – In questa prima fase lavoreremo a fianco dei nostri associati per fornire tutte le informazioni sui requisiti di qualità che si stanno definendo a livello europeo, per favorire l'implementazione in Italia del progetto ESTA e rafforzare la sua presenza nel Sud Europa”.

Giuseppe Carli è il nuovo presidente di Assosementi

Giuseppe Carli, 48 anni, è il nuovo presidente di Assosementi. Succede



Giuseppe Carli

a Guido Dall'Ara, alla guida dell'associazione dal 2014. Carli vanta una carriera ventennale alla KWS Italia, dove attualmente ricopre il ruolo di Country Manager per l'Italia e la Grecia per il mais. In ambito Assosementi ha ricoperto per due mandati consecutivi la carica di presidente della Sezione colture industriali.

Nel corso dell'assemblea annuale dell'associazione sono inoltre stati eletti i presidenti delle cinque sezioni che compongono Assosementi. Giampaolo Piubello e Franco Brazzabeni sono confermati rispettivamente per le Sezioni Costitutori e Cereali.

Nuove nomine per Nicola Santini per la Sezione Ortive, Roberto Guarnieri per la Sezione Foraggiere e Gianluca Fusco per la Sezione Colture industriali.

Messa a punto la birra di grano saraceno

Il CREA, nel Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione in collaborazione con l'Università di Viterbo, nell'ambito del progetto Alimed, finanziato dal Ministero



Grano saraceno

delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, ha messo a punto una birra prodotta con grano saraceno.

Questa birra viene prodotta al 90% con grano saraceno tartarico, un tipo selvatico di grano saraceno, particolarmente ricco di quercetina e di rutina, dalle spiccate proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, che aiutano l'organismo a contrastare lo stress ossidativo causato da un pasto troppo abbondante o da un prolungato sforzo fisico. Inoltre, è analcolica (3%), piacevole al palato e praticamente senza glutine.

I suoi effetti benefici sono stati testati attraverso una sperimentazione condotta sullo staff tecnico della FIS (Federazione Italiana Sport Invernali) del Trentino.

I soggetti che avevano bevuto la birra di grano saraceno tartarico hanno mostrato un aumento della produzione di citochine – ossia quelle molecole che riparano i danni procurati all'organismo da stress ossidativi quali pasti abbondanti o prolungati sforzi fisici – e la contemporanea diminuzione del colesterolo.

I test proseguiranno su più ampia scala dopo le Olimpiadi, in quanto diverse Federazioni sportive hanno mostrato la loro disponibilità a partecipare alla sperimentazione, anche con una versione light.

Accordo tra Repressioni frodi e aziende sementiere per contrastare le illegalità

Firmato un accordo di collaborazione tra l'Ispettorato centrale della tutela della qualità e della repressione frodi dei prodotti agroalimentari (ICQRF) e Assosementi.

L'accordo ha l'obiettivo di rendere più efficace l'attività di controllo e contrasto alle illegalità che coinvolgono le sementi, attraverso la realizzazione di analisi di mercato, di un piano di controlli e campionamenti e l'organizzazione di giornate di studio per approfondire le problematiche del settore e scambiare informazioni sulle situazioni che possono originare forme di illegalità. Gli esempi sono molti.

Sul versante delle specie agrarie, ad esempio, la vendita o lo scambio di granella non certificata uso seme, oltre a costituire violazione della normativa sementiera, favorisce la diffusione di patogeni ed infestanti. Nel settore sementiero orticolo, invece, è crescente il diffondersi di pratiche illegali quali la riproduzione vegetativa a mezzo talea o stubs.

“L'accordo formalizza un percorso di collaborazione avviato da tempo con l'ICQRF”, ha commentato Giuseppe Carli neo presidente di Assosementi, e assicura continuità per poter

sfruttare al massimo le potenzialità in tutti i contesti e per tutte le specie, promuovere una cultura della legalità e porre le basi per ridare slancio alla competitività delle nostre filiere”.

Nuove varietà per tappeti erbosi

Il mondo delle sementi da tappeto erboso è in grande evoluzione. Le specie più utilizzate oggi nella formazione e rigenerazione dei prati sono Loietti e *Festuca arundinacea*, che hanno indubbe qualità ma essendo specie cespitose, poco si allargano in senso orizzontale lasciando spazi vuoti dove le malerbe trovano spazio.

Oggi infatti la riduzione dell'impiego dei prodotti fitosanitari nel tappeto erboso in seguito alle nuove norme comunitarie e nazionali introdotte dal Piano di Azione Nazionale (PAN), comporta maggiore attenzione alla prevenzione delle varie problematiche tramite nuove strategie di manutenzione del tappeto erboso.

In questi anni il miglioramento genetico ha lavorato per modificare, tramite selezione massale, le piante di queste specie che in determinate condizioni producono dei germogli laterali striscianti, anche se brevi. Dopo anni di selezione, sono ora presenti sul mercato nuove varietà di *Festuca arundinacea* e *Lolium perenne* che sono in grado



Festuca arundinacea

di produrre pseudostoloni che aumentano la capacità rigenerativa del prato e soprattutto la capacità di coprire il terreno. Queste cultivar sono caratterizzate dalla tendenza a strisciare nel terreno e d'invadere gli spazi come fa la *Poa pratensis*.

Un gruppo di lavoro permanente per la protezione delle piante

In occasione del convegno "Il settore sementiero: sfide attuali e scenari futuri" che ha aperto l'assemblea annuale di Assosementi, Bruno Caio Faraglia, dirigente del Dipartimento delle Politiche Europee ed Internazionali dello Sviluppo Rurale del MIPAAF ha presentato un progetto finalizzato alla costituzione del Gruppo di lavoro permanente per la protezione delle piante.

Il Gruppo di lavoro ha l'obiettivo di favorire un maggiore coordinamento tra il Servizio fitosanitario nazionale, le università e gli enti di ricerca, i laboratori, i settori produttivi le associazioni di categoria e le organizzazioni produttori.

Il Gruppo sarà strutturato in sette sottosezioni, una delle quali dedicata alle sementi dove siederanno rappresentanti delle associazioni sementiere, del commercio, delle associazioni agricole.

Mappato il genoma della carota

Un gruppo di studiosi statunitensi ha identificato la sequenza del genoma della carota (*Daucus carota* L.), giungendo ad identificare 32.113 geni, di cui 10.530 geni unici per la carota. Per comprendere il processo di domesticazione della carota sono state sequenziate 35 accessioni selvatiche di carota, rappresentative della diversità genetica del genere *Daucus*.

Lo studio ha permesso di rilevare il gene responsabile dell'accumulo di carotene nelle radici, il pigmento che conferisce il caratteristico colore arancione. Grazie all'attività di breeding condotta negli USA, è stato possibile aumentare il contenuto medio di carotene del 50% rispetto alle varietà esistenti 40 anni fa.

La carota è l'ortaggio più importante della famiglia delle Apiaceae, alla quale appartengono anche erbe aromatiche, spezie e piante officinali, quali prezzemolo, finocchio, sedano, coriandolo e cumino. Secondo le indicazioni statistiche della FAO, la produzione mondiale di carote è quadruplicata dal 1976 al 2013.

Risultati del primo anno di controllo sulla presenza di OGM negli alimenti

Dal 2015 è iniziata la programmazione del Piano nazionale di controllo ufficiale sulla presenza di organismi geneticamente modificati (OGM) negli alimenti per il quadriennio 2015-2018.

Il Ministero della salute, in collaborazione con il Centro di riferimento nazionale per la ricerca degli OGM (CROGM) e l'Istituto superiore di sanità, ha predisposto il Piano quadriennale al fine di facilitare la programmazione e il coordinamento delle attività di controllo svolte, in questo specifico settore, dalle Autorità sanitarie regionali e provinciali. Ciò in applicazione sia della normativa quadro del settore degli OGM, i regolamenti comunitari nn. 1829/2003 e 1830/2003, sia del regolamento CE n. 882/2004 relativo ai controlli ufficiali.

La valutazione generale dei risultati 2015 è positiva. Per un numero totale di campioni prelevati ed analizzati pari a 688, la percentuale di quelli positivi è stata del 2%. Ciò conferma sempre di più sia la consapevolezza crescente degli operatori del settore alimentare, sia l'efficacia dei controlli ufficiali messi in atto.

L'attività all'importazione si è mantenuta costante, con i 116 campionamenti effettuati, ed ha consentito di intercettare 4 partite non conformi per la presenza di riso GM non autorizzato proveniente dalla Cina.

Rapporto CREA sul commercio con l'estero dei prodotti agroalimentari

Si conferma anche per il 2015 la performance positiva del commercio con l'estero dell'agroalimentare italiano registrando un incremento rispetto al 2014 del 7,4% dell'export (37,2 miliardi di euro nel 2015) e del 2% dell'import (42 miliardi di euro).

Tale dinamica ha prodotto una riduzione del deficit della bilancia agroalimentare, che è sceso, per la prima volta negli ultimi 25 anni, sotto la soglia dei 5 miliardi di euro (-4.782 milioni). Ciò ha comportato un miglioramento del saldo di 1,73 miliardi di euro rispetto al 2014.

Questa è la fotografia scattata dal CREA, con il suo centro di Politiche e bioeconomia, nel rapporto *Commercio con l'estero dei prodotti agroalimentari*, presentato in occasione dell'evento *Il commercio agroalimentare dell'Italia e il made in Italy* organizzato da ICE e CREA in collaborazione con SMEA.



In particolare l'export è stato trainato dall'aumento dei volumi esportati (+9,3) a fronte di una diminuzione dei prezzi (-1,8%). La crescita dell'import, invece, è dovuta all'aumento dei prezzi (+4,5%) a fronte di una flessione dei volumi importati (-2,4%).

Il valore delle esportazioni (37,2 miliardi di euro) è ripartito in 6,6 miliardi per il settore primario (in particolare frutta fresca e legumi e ortaggi freschi), in 23 miliardi per l'industria alimentare (tra cui derivati dei cereali, prodotti lattiero-caseari, ortaggi trasformati e oli e grassi) e in 7,4 miliardi per quello delle bevande (principalmente vino). Dal lato delle importazioni (42 miliardi), 14 miliardi riguardano il settore primario, 26 miliardi l'industria alimentare e 1,5 miliardi quello delle bevande.

Anche nel 2015 il nostro principale partner commerciale per l'export agroalimentare è l'area dell'UE28 (65,7%), seguito da Nord America (11,8%), Paesi Asiatici non mediterranei (8,1%) e gli Altri Paesi Europei non mediterranei (6,3%).

Le esportazioni del *Made in Italy*, che coprono il 74% circa del totale agroalimentare, hanno raggiunto il valore di 27,4 miliardi di euro circa, con un incremento del 7,1% rispetto al 2014 legato all'aumento sia dei prezzi sia delle quantità.

In particolare il *Made in Italy* agricolo (tra cui mele, uva da tavola e kiwi) si è attestato su 4,2 miliardi di euro circa, il *Made in Italy* trasformato (i cui principali comparti sono il vino confezionato, il pomodoro trasformato, i formaggi, i salumi e l'olio d'oliva) su 15,5 miliardi e *Made in Italy* dell'industria alimentare (tra cui pasta, prodotti da forno e prodotti dolciari a base di cacao) su 7,7 miliardi di euro.

«I dati elaborati dal CREA – ha spiegato *Ida Marandola*,

Direttore Generale – confermano anche per quest'anno il ruolo di rilievo del settore agroalimentare nella bilancia commerciale del nostro Paese.

Per il quarto anno consecutivo il peso dell'agroalimentare sull'export complessivo di merci è aumentato, raggiungendo la quota del 9%. Si tratta del valore più elevato degli ultimi 25 anni».

Sovrapposizione fra brevetti per invenzioni e privativa per varietà vegetali

L'Ufficio Italiano Brevetti e Marchi (UIBM) ha recentemente organizzato un seminario sulla proprietà intellettuale per chiarire e illustrare le possibili sovrapposizioni fra brevetti per invenzione e privativa varietale.

L'evoluzione delle tecnologie nell'ambito della selezione genica per la produzione di nuove varietà vegetali è tale che è sempre più difficile separare l'utilizzo di un processo biologico da un processo in cui è richiesto l'intervento tecnico umano.

Diventa quindi difficile distinguere il limite fra le due fattispecie e di conseguenza le due possibilità di protezione.

L'incontro ha consentito di fare il punto sull'argomento 'brevetizzazione' delle varietà vegetali evidenziando le possibili interferenze che recenti decisioni dell'Ufficio Comunitario Brevetti – EPO (nello specifico le decisioni relative ai casi Broccoli II e To-mato II) potrebbero determinare sul sistema della privativa vegetale normata dal Reg. 2100/94.

Francesco Mattina, responsabile del dipartimento legale del CPVO, l'organismo comunitario deputato alla gestione delle privative vegetali, ha presentato l'attuale situazione e i futuri impegni che da ottobre vedranno riprendere il confronto fra lo stesso CPVO e l'EPO con l'obiettivo di portare chiarezza su diversi ed importanti aspetti che al momento vedono i due impianti normativi su posizioni contrastanti.

Assosementi ha partecipato all'evento portando il punto di vista del settore sementiero.

Alberto Lipparini ha ribadito la posizione dei sementieri italiani ed europei (ESA) a sostegno della privativa vegetale in quanto ritenuto valido impianto normativo di tutela degli investimenti a supporto della ricerca e dell'innovazione capace di garantire il libero accesso alle innovazioni e quindi di tutelare l'attività dei costitutori grazie allo strumento della 'breeders exemption' ed escludendo nel contempo la brevettabilità delle varietà vegetali.

Culture sementiere autunno-vernine

La primavera 2016 è stata caratterizzata da tempo instabile, fin dall'inizio del mese di aprile le precipitazioni hanno colpito tutto il territorio nazionale con intensità variabile e con temperature al disotto delle medie stagionali. Solo nella seconda decade di giugno nelle regioni meridionali è arrivata l'estate mentre il Centro ed il Nord Italia sono al momento in una continua situazione di tempo variabile con violente precipitazioni accompagnate da forti raffiche di vento.

Queste condizioni climatiche di enorme variabilità stanno inevitabilmente condizionando le fasi vegetative finali delle colture sementiere autunno vernine.

Cereali a paglia: all'inizio della terza decade di giugno nelle regioni del Centro e Nord Italia sono iniziate le prime trebbiature, approfittando di una finestra di tempo stabile. Le notizie che giungono dalle ditte sementiere, riportano per orzo e frumento tenero produzioni e pesi specifici particolarmente positivi. Per il frumento duro non si hanno ancora notizie certe, ma i primi dati di produzioni sementiere non hanno al momento dato buoni risultati. Si prevede comunque un peso specifico leggermente sotto la media della specie dovuto per lo più alla presenza di molte produzioni allettate da oramai molto tempo, in cui la coltura non è riuscita a pieno a trasferire i nutrienti nella cariosside. In alcune zone si sono anche evidenziate problematiche tardive di attacchi fungini che hanno interessato le varietà maggiormente sensibili causando la formazione di cariossidi poco sviluppate. Per meglio valutare l'annata cerealicola avremmo bisogno di più dati e non mancherò nel prossimo numero di aggiornarvi sul risultato definitivo delle raccolte 2016.

Specie industriali a semina primaverile: tutte queste specie si stanno avvantaggiando di questa situazione climatica. Le coltivazioni di mais più precoci, iniziano già a emettere pennacchi e sete; il girasole è in piena levata con moltiplicazioni già a bottone fiorale o con la calatide in apertura. Questa specie, come la precedente, per il terzo anno consecutivo ha ridotto ulteriormente le sue superfici produttive, mentre la soia, che attualmente è ai primi stadi di sviluppo, si gode con queste condizioni climatiche favorevoli, una buona radicazione e un buon sviluppo iniziale, mentre anche per il 2016 le superfici per la produzione di seme rimangono per il terzo anno consecutivo superiori ai 10.000 ettari.

Barbabietola: questa coltura a trapianto primaverile si sta avvantaggiando delle precipitazioni frequenti, ma al

contrario di altre, essendo in piena fioritura, mal sopporta gli sbalzi di temperatura e l'alta umidità relativa che ne limita il trasferimento di polline. È da segnalare una problematica emersa a causa della tardività dei trapianti, che per motivi climatici sono in parte slittati nel mese di marzo, e hanno evidenziato la sensibilità di alcune linee impollinanti per la lunga conservazione in cella a temperatura e umidità controllata, con la conseguenza di una montata a seme non uniforme in tutte le piante. Questo si è riscontrato in una piccola percentuale di colture e non andrà comunque a ridimensionare una previsione di produzione buona in un'annata in cui la superficie di questa specie ritorna in crescita e supera di nuovo i 3000 ha complessivi di moltiplicazione.

Foraggiere: le specie graminacee si sono avvantaggiate più delle altre per le frequenti piogge e le produzioni del 2016 risultano buone, con una superficie produttiva stazionaria rispetto alla scorsa annata. Diversa la situazione delle specie leguminose. Per i trifogli, dove è consuetudine sfalcare per la pulizia delle colture destinate a seme nei mesi di aprile maggio, il maltempo ne ha ritardato il taglio, con la conseguenza che al momento attuale si riscontra una vasta situazione di stadi vegetativi, con la probabilità che quelli più tardivi saranno in fioritura in un momento stagionale particolarmente caldo e non idoneo per una buona allegagione. La medesima situazione la troviamo anche nell'erba medica, dove i primi tagli, normalmente eseguiti a fine aprile, prima decade di maggio, sono slittati alla fine del mese di maggio per le condizioni climatiche instabili e per un prezzo del foraggio di primo sfalcio particolarmente basso. Come per i trifogli, le produzioni sementiere di erba medica, rischiano di trovarsi in piena fioritura nel periodo più caldo dell'estate, con la possibile conseguenza di allegagioni non ottimali e quindi di produzioni limitate. Le superfici investite non hanno subito grosse variazioni rispetto al 2015 per i trifogli, mentre per l'erba medica siamo ancora in una fase di recepimento delle domande, ma ad ora si può già prevedere almeno una superficie a richiesta di sopralluogo in campo senza troppe variazioni rispetto al 2015.

Ulteriori notizie sulle produzioni nel prossimo numero dove potremmo riferire l'andamento definitivo dei raccolti 2016.



Le carte di controllo: uno strumento importante per il laboratorio accreditato

Per assicurare la qualità dei risultati di prova all'interno di un laboratorio di analisi, tra le altre iniziative intraprese nell'ambito di un sistema di assicurazione della qualità, è necessario adottare sistemi di misurazione dei processi e impegnarsi per analizzare i dati raccolti. Per il laboratorio, l'obiettivo finale rimane il continuo miglioramento della propria performance.

Il controllo degli strumenti utilizzati, la valutazione degli analisti e i risultati dei *Proficiency Test* tra laboratori forniscono una quantità di dati che - se analizzati statisticamente - diventano uno strumento di grandissima utilità.

L'esito positivo del controllo statistico conferma che l'intero processo si mantiene ad un livello accettabile e stabile e assicura la conformità dei risultati d'analisi.

I risultati della verifica vengono infatti analizzati al fine di individuare non solo conclamati errori, ma anche eventuali andamenti non naturali dei processi ripetitivi; le indicazioni che si ottengono permettono di elaborare

strategie per prevenire la produzione di risultati di prova non conformi alle specifiche e per evitare le conseguenze indesiderate che ne possono derivare, ad esempio in termini economici o anche di immagine.

In sintesi, migliore è la conoscenza del processo, maggiore sarà la possibilità di miglioramento.

Per controllare i processi d'analisi il laboratorio può avvalersi di carte di controllo (vedi la figura 1, esempio di carta di controllo per una bilancia), utili innanzitutto per registrare e tracciare l'esito delle verifiche di qualità.

Ancor più, una carta di controllo rappresenta un mezzo grafico che facilita la visualizzazione e quindi l'individuazione dell'esito sortito dal controllo del processo in esame e il suo andamento nel tempo.

La carta di controllo permette di individuare due tipi di variabilità, quella casuale dovuta a cause "non identificabili" e quindi non eliminabili e la variabilità per cause di natura sistematica, attribuibili a problematiche legate ad un irregolare funzionamento delle attrezzature, ai materiali utilizzati, al fattore umano, alla non corretta applicazione di metodi, a fattori ambientali o di natura gestionale.

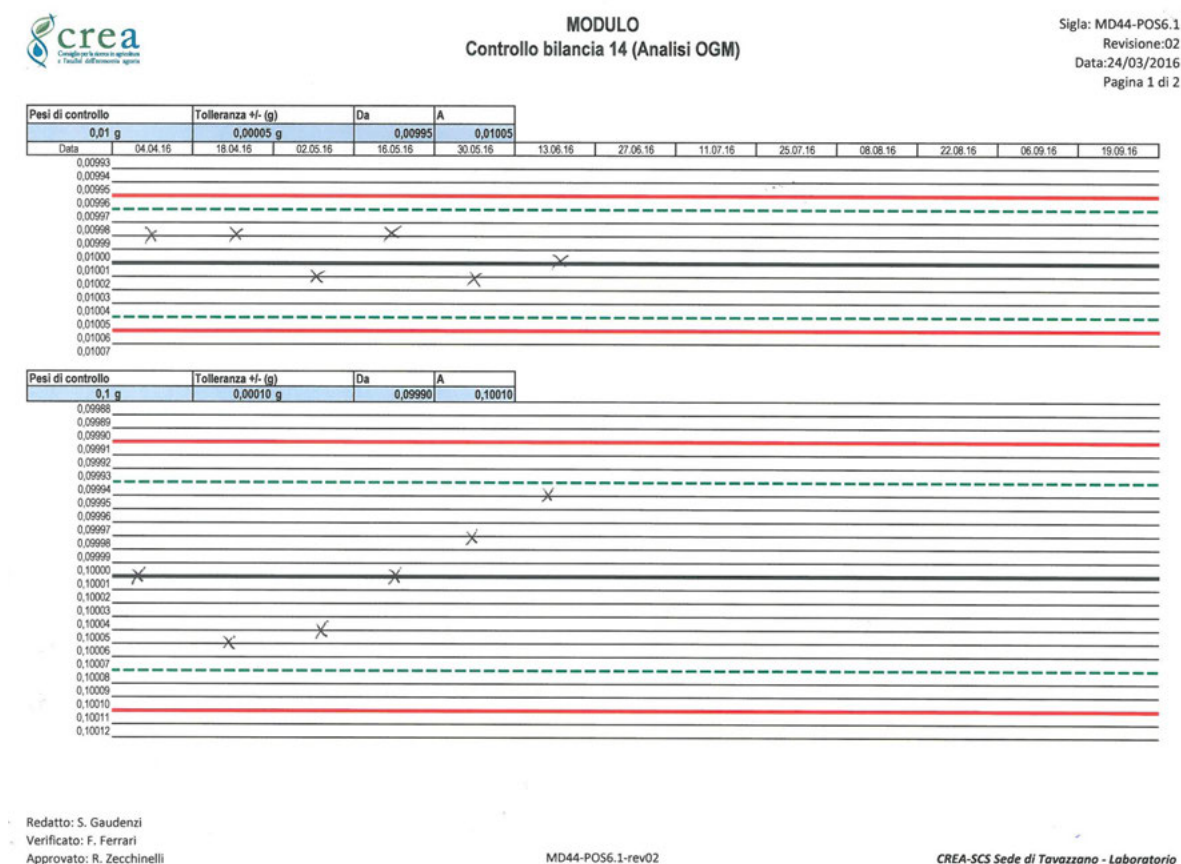


Figura 1. Una carta di controllo utilizzata dal laboratorio SCS di Tavazzano per il controllo di una bilancia

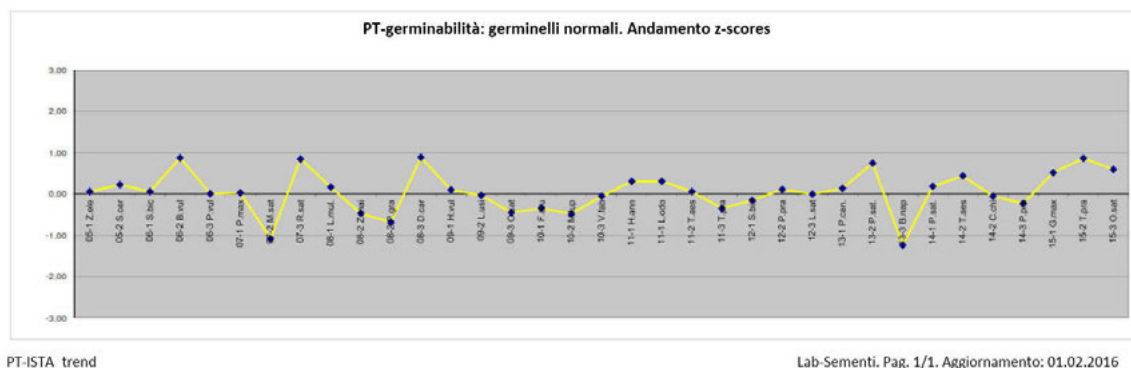


Figura 2 Una carta di controllo utilizzata dal laboratorio SCS di Tavazzano per analizzare l'andamento dei *Proficiency Test* sulle analisi di germinazione

Queste cause sono quindi identificabili e, tramite l'apertura di un'azione correttiva, devono essere identificate per poter essere eliminate o quantomeno ridotte ad un livello accettabile.

Oltre ai limiti di azione, è utile fissare anche limiti di sorveglianza: un valore che cade al di fuori di questi rappresenta un segnale di allarme che preannuncia la possibile insorgenza di un problema più serio. Ad esempio, l'inizio del malfunzionamento di uno strumento, segnalato dal superamento dei limiti di sorveglianza, non deve essere sottovalutato ed è utile avviare le indagini mirate ad individuarne le possibili cause (azione preventiva) e a riportare lo strumento al suo funzionamento ottimale.

La carta di controllo consente anche di individuare eventuali linee di tendenza, sulla base delle quali il laboratorio organizza azioni atte a prevenire errori o comunque a migliorare la qualità del proprio lavoro.

Un tipico caso è rappresentato dall'analisi dei risultati ottenuti con la partecipazione a *Proficiency Test* (vedi figura 2). Anche quando questi risultati sono tutti ottimi, può manifestarsi una tendenza del laboratorio (o di un certo analista) a sottostimare o sovrastimare un determinato parametro (ad esempio, la percentuale di germinelli classificati come anormali nelle prove di germinabilità è sempre maggiore o minore della media, anche se con scarti di lieve entità). In una situazione come questa, la carta di controllo consente di evidenziare facilmente la tendenza e quindi di intervenire per approfondirne le cause e per correggerla.

Sara Gaudenzi

La ricerca di patogeni tellurici nel suolo presso il laboratorio SCS di Battipaglia

Il servizio di diagnostica svolto dal Laboratorio di Analisi Fitopatologiche del CREA-SCS (Centro di sperimentazione e certificazione delle sementi) di Battipaglia offre oggi la possibilità di controllare, oltre che lo stato fitosanitario dei vegetali, anche le condizioni fitosanitarie del suolo.

La conoscenza dello spettro dei microrganismi residenti in un suolo è da sempre una necessità fortemente espressa dagli agricoltori. Avere informazioni sulla presenza di eventuali microrganismi patogeni in un suolo, consente di effettuare una scelta maggiormente oculata della specie vegetale da coltivare, correndo il minor rischio possibile di



Figura 3. Un campione di terreno infetto

infezioni della coltura, compatibilmente con la vocazione dei terreni e con l'indirizzo produttivo delle aziende.

Di recente, i laboratori del CREA-SCS hanno messo a punto un protocollo di analisi per rilevare la presenza di alcuni patogeni nel suolo. Per circostanziare la ricerca, è necessario che gli agricoltori forniscano il maggior numero di informazione agli analisti: colture precedentemente presenti sul terreno, eventuali problematiche fitosanitarie rilevate, trattamenti e lavorazioni eseguite e coltura che si intende realizzare.

Il laboratorio fornisce tutte le informazioni necessarie all'agricoltore per effettuare il campionamento del terreno in azienda ed esegue le analisi sul campione conferito. L'analisi prevede una omogeneizzazione del campione e la sospensione di questo in una soluzione salina tampinata. A seconda del patogeno ricercato, la soluzione viene incubata su substrati specifici e a temperature controllate e, dopo alcuni giorni, viene effettuata l'osservazione delle colonie sviluppatesi in coltura.

Ad oggi, il protocollo è stato impiegato per la ricerca di funghi della specie *Fusarium oxysporum*. Una volta individuate le colonie sospette, queste vengono saggiate su un set di specie ospiti suscettibili e di interesse per il cliente per poterne caratterizzare la forma *specialis* (e quindi il suo ospite) e la patogenicità in vivo.

Il test viene eseguito inoculando piante sane con le colonie sospette e osservando i sintomi tipici della malattia sulla specie vegetale.

Con questo metodo, è stato possibile rilevare la presenza di *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae*, agente della tracheofusariosi della lattuga, e fornire una importantissima informazione al produttore che ha potuto indirizzare la sua scelta verso altre specie ortive non suscettibili al patogeno e comunque compatibili con il suo impianto e le esigenze commerciali di mercato.

Loredana Sigillo, Giovanna Serratore,
Gennaro Marino, Domenico Zito

Interventi di ricerca per l'innovazione della filiera della rucola nella Piana del Sele

La coltivazione di rucola selvatica (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) in Italia rappresenta un settore in forte crescita; in particolare, la Piana del Sele (provincia di Salerno) rappresenta il maggior polo produttivo nazionale e uno tra i principali punti di riferimento nel mercato europeo.

A tale espansione, corrisponde tuttavia un carente stato di ricerca ed innovazione; infatti, poche sono state le energie investite in ambito scientifico e nel progresso di filiera, con corrispondente scarso numero di pubblicazioni prodotte e basso numero di brevetti e varietà commercializzate.

Le ripercussioni di tale situazione iniziano a sentirsi in virtù del contesto di relazioni contrattuali che impone ai produttori un continuo sforzo di adattamento per soddisfare i requisiti di consumatori e clienti sempre più esigenti in un mercato basato sulla semplificazione di approvvigionamento e trasformazione degli alimenti.

Al fine di contribuire allo sviluppo della filiera, il Centro di Ricerca per l'Orticoltura di Pontecagnano (ORT) e il Centro di Sperimentazione e certificazione delle sementi di Battipaglia (SCS) (oggi confluiti nel CREA, Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria), in un partenariato pubblico-privato, hanno collaborato alla realizzazione al progetto sperimentale FISER.

Il progetto FISER "Innovazione e potenziamento della filiera sementiera della rucola per la IV gamma" finanziato dai Piani di Sviluppo Rurale, nell'ambito della programmazione Feasr 2007/2013, si è posto l'obiettivo di dare delle risposte alle problematiche di settore con particolare riferimento alle esigenze della Piana del Sele. Il progetto è stato coordinato dal CREA-ORT e ha coinvolto diverse professionalità del CREA e due aziende private: La Semi-orto Sementi di Sarno e l'azienda Capacchione di Bellizzi (http://www.agricoltura.regione.campania.it/pubblicazioni/pdf/Ortofrutticolo_print.pdf pp 43-52).

Le finalità previste dal progetto hanno riguardato quattro obiettivi realizzativi:

- a. selezione di nuove varietà
- b. miglioramento qualitativo
- c. studio delle problematiche fitopatologiche
- d. istituzione di un registro varietale per la specie *Diplotaxis tenuifolia*.

Al fine di selezionare nuove varietà, è stato avviato un programma di miglioramento genetico presso CREA-ORT di Pontecagnano con lo scopo di individuare genotipi d'interesse per diversi caratteri, mediante incroci diretti e selezione mirata nell'ambito di popolazioni segreganti. Sono state selezionate linee con diverso tipo di frastagliatura fogliare (figura 4), portamento della pianta più adatto alla raccolta meccanica, tempi di fioritura tardivi e diversa attitudine all'accumulo dei nitrati.



Figura 4. Frastagliatura della foglia in rucola selvatica

Si tratta di “breeding lines”, alcune in stato avanzato e potenzialmente collocabili sul mercato, altre utilizzabili come fonti per il trasferimento di caratteri utili nei programmi di miglioramento genetico.

Le maggiori difficoltà riscontrate hanno riguardato da un lato, la difficoltà ad ottenere ibridi interspecifici, problema dovuto al diverso corredo cromosomico delle specie di rucola; dall'altro, la difficoltà a trasferire i caratteri di maggior interesse commerciale data la base genetica complessa di questi. Inoltre con l'ausilio della genetica molecolare sono stati identificati marcatori specifici in grado di discriminare le diverse varietà disponibili e facilitare la selezione di queste. Alcuni di questi sono in fase di validazione.

Il CREA-SCS si è occupato della caratterizzazione dei materiali commerciali maggiormente diffusi nella Piana del Sele. Il primo passo del lavoro si è svolto in una indagine di mercato tra aziende agricole e ditte sementiere al fine di collezionare campioni dei materiali considerati, al momento, maggiormente apprezzati dagli agricoltori.

La caratterizzazione ha riguardato aspetti morfologici e taluni aspetti fisiologici, quali la resistenza a due tra i patogeni maggiormente pericolosi per la coltura: il batterio *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e il fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, ambedue trasmissibili per seme.

Una prima fase della ricerca ha riguardato la caratterizzazione fisiologica e molecolare delle collezioni dei due patogeni depositate presso il CREA-SCS, consentendo l'identificazione rigorosa dei due microrganismi.



Figura 5. Saggi di resistenza su *Eruca sativa* e su *Diplotaxis tenuifolia*

In una seconda fase di sperimentazione, le varietà commerciali di rucola sono state sottoposte a saggi di resistenza *in vivo*, in condizioni standard, per evidenziare i comportamenti di resistenza o suscettibilità alle due malattie (figura 5), nei materiali presenti sul mercato e delle linee sviluppate dal CREA-ORT *Eruca sativa* e su *Diplotaxis* spp.

Gli studi effettuati dall'intero gruppo di lavoro hanno messo in luce interessanti risultati per quanto riguarda la presenza di resistenze a *Fusarium* sia nelle varietà commerciali che nelle nuove linee mentre la resistenza al batterio *Xanthomonas* è stata riscontrata solo in alcune delle nuove linee sperimentali in fase di selezione presso CREA-ORT.

I risultati ottenuti sono in fase di pubblicazione su riviste scientifiche e gettano le basi per futuri programmi di miglioramento suggerendo l'utilizzo di ulteriori metodologie per i caratteri complessi così come un approccio integrato per la gestione della coltura (pratiche agronomiche, concimazione, ecc).

I risultati del progetto FISER sono stati presentati nel convegno finale “Presente e futuro nelle ortive per la IV gamma” (<http://www.crea.gov.it/wp-content/uploads/2015/09/convegno-17-09-15.pdf>) svoltosi presso la struttura del CREA-ORT.

Pasquale Tripodi, Giovanna Serratore,
Loredana Sigillo



Istituzione registro volontario di varietà di soia da consumo alimentare fresco

Con Decreto MiPAAF 27 aprile 2016 (GU n. 114 del 17 maggio 2016) è stato istituito il registro volontario di nuove varietà di soia (*Glycine max* (L.) Merrill) destinate al consumo alimentare fresco. Tale istituzione è risultata necessaria considerando che alcune varietà di soia non ricadono negli scopi previsti dalla direttiva 2002/57/CE relativa alla commercializzazione di sementi di piante oleaginose e da fibra, avendo, invece, come prima destinazione il consumo alimentare fresco.

In riferimento, quindi, alla manifestazione di interesse da parte di associazioni di categoria per le varietà di soia destinate al consumo alimentare fresco, considerando che la normativa europea non prevede un registro per dette varietà nell'ambito del registro nazionale delle specie ortive, è stato istituito apposito registro. I costitutori di nuove varietà di soia per il consumo fresco potranno presentare domanda di iscrizione al registro nazionale tramite le modalità di cui al decreto ministeriale 26 maggio 2015 (vedere Dal Seme 1/2016).

A seguito di richiesta, considerata la destinazione d'uso con Decreto MiPAAF 6 giugno 2016, due varietà di soia precedentemente iscritte al registro nazionale delle specie agrarie sono state iscritte al registro volontario di recente istituzione.

Linee guida CPVO e UPOV per l'iscrizione ai registri delle varietà: recepimento DIR. 2015/1168/UE

Con Decreto MiPAAF 17 marzo 2016 (GU n. 117 del 20 maggio 2016) è stata recepita la direttiva 2015/1168/UE

Direttiva	Decreto MiPAAF di recepimento	Data di applicazione del Decreto MiPAAF
2002/8/CE	11/10/2002	26/11/2002
2003/90/CE e 2003/91/CE	14/01/2004	04/02/2004
2005/91/CE	12/04/2006	03/05/2006
2006/127/CE	12/03/2007	30/03/2007
2007/48/CE e 2007/49/CE	25/10/2007	01/11/2007
2008/83/CE	16/09/2008	11/10/2008
2009/97/CE	12/11/2009	01/01/2010
2010/46/UE	19/10/2010	01/01/2011
2011/68/EU	20/07/2011	01/01/2012
2012/8/EU	26/07/2012	01/10/2012
2012/44/EU	22/04/2013	01/01/2014
2013/57/EU	20/12/2013	01/07/2014
2014/105/EU	09/09/2015	01/01/2016
2015/1168/EU	17/03/2016	01/07/2016

Corrispondenza tra le direttive comunitarie e i decreti ministeriali di recepimento

della Commissione del 15 luglio 2015 (vedere dal Seme n. 1/2016) con la quale è stato aggiornato l'elenco delle linee guida CPVO (e UPOV) che devono essere impiegate per l'iscrizione delle varietà di specie agricole e ortive. Le nuove linee guida o gli aggiornamenti delle precedenti riguardano navone, pisello da foraggio, erba cipollina, bietola da coste, zucca, pisello rugoso, pisello rotondo e pisello dolce, ravanella, ramolaccio e scorzonera. I nuovi protocolli sono entrati in vigore il 1° luglio 2016.

I protocolli CPVO sono reperibili all'indirizzo: www.cpvo.europa.eu, quelli UPOV all'indirizzo www.upov.int

Orzo ibrido

Con Decreto MiPAAF 17 marzo 2016 (GU n. 117 del 20 maggio 2016) è stata recepita la direttiva di esecuzione n. 2015/1955/UE della Commissione del 29 ottobre 2015 (Gazzetta Ufficiale UE L 284 del 30 ottobre 2015), che modifica gli allegati I (condizioni cui deve soddisfare la coltura) e II (condizioni cui devono soddisfare le sementi) della direttiva 66/402/CEE del Consiglio relativa alla commercializzazione delle sementi di cereali, in relazione all'introduzione di indicazioni per l'orzo ibrido.

A seguito del recepimento della direttiva, sono modificati gli allegati VI e VII del DPR 8 ottobre 1973, n. 1065, nei

quali sono introdotte specifiche tecniche per la tipologia di orzo ibrido in relazione alla componente di controllo in campo e di selezione meccanica.

In particolare, si segnala che le nuove disposizioni prevedono che la produzione delle sementi certificate di orzo ibrido possa essere effettuata in coltivazione mista mediante combinazione di un componente femminile maschio-sterile e un componente maschile per ripristinare la fertilità.

Cataloghi comuni delle varietà delle specie di ortaggi e di piante agricole

Sono stati pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale UE C 196 del 2 giugno 2016 e C 226 del 22 giugno 2016 rispettivamente il quinto complemento alla 34^a edizioni del Catalogo comune delle varietà delle specie di piante agricole ed il quarto complemento alla 34^a edizione del Catalogo comune delle varietà delle specie di ortaggi.

Provvedimenti nazionali sulle varietà vegetali

Decreto del Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali		Tipo di provvedimento	Specie interessate	GU Serie Generale
Data	N°			
18 Febbraio 2016	16Ao1940	Cancellazione	Cereali a paglia e mais	n.59 del 11-3-2016
18 Febbraio 2016	16Ao1986	Iscrizione	Cereali a paglia	n.60 del 12-3-2016
25 Febbraio 2016	16Ao2162	Rettifica decreto d'iscrizione	Ortive	n.65 del 18-3-2016
25 Febbraio 2016	16Ao2163	Iscrizione	Ortive	n.65 del 18-3-2016
2 Marzo 2016	16Ao2170	Iscrizione	Colture industriali	n.66 del 19-3-2016
7 Ottobre 2015	16Ao2457	Cancellazione	Ortive	n.74 del 30-3-2016
7 Ottobre 2015	16Ao2496	Iscrizione	Ortive	n.75 del 31-3-2016
7 Ottobre 2015	16Ao2498	Iscrizione	Ortive	n.75 del 31-3-2016
10 Marzo 2016	16Ao2497	Iscrizione	Ortive	n.75 del 31-3-2016
25 Marzo 2016	16Ao2640	Rettifica decreto di rinnovo, cancellazione e proroga della commercializzazione	Ortive	n.81 del 7-4-2016
24 Marzo 2016	16Ao2639	Cancellazione	Ortive	n.81 del 7-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3052	Iscrizione	Colture industriali	n.92 del 20-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3053	Cancellazione	Colture industriali	n.92 del 20-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3061	Iscrizione	Colture industriali	n.93 del 21-4-2016
11 Aprile 2016	16Ao3130	Iscrizione	Cereali a paglia e mais	n.96 del 26-4-2016
11 Aprile 2016	16Ao3131	Variazione di denominazione	Mais	n.96 del 26-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3207	Rettifica decreto di rinnovo, cancellazione e proroga di commercializzazione	Foraggere	n.97 del 27-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3208	Iscrizione	Colture industriali e mais	n.97 del 27-4-2016
5 Aprile 2016	16Ao3214	Variazione del responsabile della conservazione in purezza	Cereali a paglia	n.98 del 28-4-2016
28 Aprile 2016	16Ao3836	Iscrizione	Ortive	n.117 del 20-5-2016
12 Maggio 2016	16Ao4118	Modifiche decreto d'iscrizione	Colture industriali	n.128 del 3-6-2016
20 Maggio 2016	16Ao4163	Iscrizione varietà nel registro nazionale dei portainnesti	Portainnesto per ortive	n.130 del 6-6-2016
30 Maggio 2016	16Ao4401	Iscrizione	Ortive	n.137 del 14-6-2016

I decreti che riguardano le variazioni al Registro Nazionale delle varietà agrarie e ortive vengono pubblicati dal Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali sulla Gazzetta Ufficiale Italiana.

Nella tabella vengono prese in considerazione le Gazzette Ufficiali che vanno dalla n. 59 del 11-3-2016 alla n. 144 del 22-6-2016 che hanno ufficializzato 22 provvedimenti, con questi sono state:

- Iscritte 5 varietà di cereali a paglia, 11 di mais, 30 di colture industriali, 38 ortive, inoltre è stata iscritta 1 portainnesti;
- Cancellate 13 varietà di cereali a paglia, 8 di mais, 2 di colture industriali e 1 ortiva;
- Variata la responsabilità del conservatore in purezza di 7 cereali a paglia;
- Variata la denominazione di 1 mais.

Inoltre sono stati emanati 4 decreti che rettificano o modificano provvedimenti già pubblicati.

[a cura di Marco Faina]

Le conoscenze genomiche stanno cambiando il miglioramento genetico del frumento

Il frumento ha un ruolo primario nell'alimentazione mondiale. Nell'ultimo decennio, grazie alla genetica molecolare e alla genomica, sono stati identificati numerosi geni che controllano caratteri fenotipici di rilevanza agronomica e sistemi avanzati di genotipizzazione con marcatori molecolari hanno permesso lo sviluppo della marker assisted selection. Nei prossimi anni la disponibilità di una sequenza genomica di elevata qualità consentirà di raffinare ulteriormente le tecniche del miglioramento genetico

Delfina Barabaschi, Elisabetta Mazzucotelli, Stefano Delbono, Francesca Desiderio, Luigi Cattivelli

Genomic will boost wheat breeding

Wheat has a primary role as a staple food for the world's population. In the last decade thanks to progresses in molecular genetics and genomics numerous genes and loci controlling traits of agronomic importance were identified. Advanced genotyping systems using molecular markers have allowed the development of marker assisted selection. In the near future, the availability of the high quality genome sequence will allow to further refine the techniques for wheat genetic improvement.

Il frumento è uno tra i cereali più coltivati al mondo con una produzione di circa 700 milioni di tonnellate/anno e fornisce circa il 20% delle calorie e delle proteine necessarie all'alimentazione umana.

In Italia, il frumento rappresenta una coltura tradizionale coltivata già prima della civiltà Romana, tutt'ora estremamente diffusa con circa 600.000 ha di frumento tenero ed oltre 1.200.000 ha di frumento duro per una produzione di circa 3 e 4 milioni di tonnellate rispettivamente (dati ISTAT). Ciononostante il Paese importa oltre la metà del frumento tenero ed oltre un terzo del frumento duro utilizzato dall'industria alimentare (<http://www.ismeaservizi.it/seminativi/cereali>: tendenze – Frumento, n.4/2015 – 11, 2015).

Il ruolo del frumento nell'alimentazione mondiale rende questo cereale strategico per il futuro della società umana e, conseguentemente, molte risorse sono dedicate allo studio delle basi genetiche che controllano i caratteri che determinano la produzione, la qualità, la resistenza a malattie e l'adattamento alle mutevoli condizioni ambientali.

Il moderno miglioramento genetico, infatti, si basa sempre più sulla conoscenza dei geni e delle loro funzioni, e l'avanzamento delle conoscenze genomiche rappresenta una delle priorità a livello mondiale per sostenere il necessario incremento produttivo e qualitativo del frumento.

L'impellente necessità di aumentare la produzione mondiale di frumento attraverso il miglioramento genetico e l'avanzamento delle tecniche agronomiche ha spinto i Ministri dell'agricoltura del G20 a promuovere un'agenzia per il coordinamento mondiale della ricerca sul frumento (Wheat Initiative, <http://www.wheatinitiative.org/>).

Il genoma del frumento

Il genoma del frumento è particolarmente grande, 12 miliardi di basi (Gb) quello del frumento duro e 17 Gb quello del frumento tenero (per confronto il genoma del riso è di 0,4 Gb). Inoltre, oltre l'80% del genoma di frumento è rappresentato da sequenze ripetute che, pur contribuendo globalmente alla funzionalità del genoma, non codificano per alcuna specifica funzione genica.

I frumenti si sono evoluti attraverso uno (frumento duro) o due (frumento tenero) eventi di ibridazione interspecifica che hanno condotto a piante tetraploidi (frumento duro, genomi A e B) ed esaploidi (frumento tenero, genomi A, B e D) caratterizzate dalla presenza di genomi tra loro simili definiti più correttamente "omeologhi" (Figura 1).

La dimensione dei genomi, la presenza di genomi omeologhi e l'alto contenuto di sequenze ripetute rendono il sequenziamento del genoma dei frumenti una sfida ancora aperta. Nel 2014 è stata pubblicata una prima bozza del genoma del frumento tenero (IWGSC, 2014) coordinata dall'International Wheat Genome Sequencing Consortium (<http://www.wheatgenome.org/>). Il progetto è stato realizzato attraverso un sequenziamento parziale condotto su singoli bracci cromosomici purificati, mediante la tecnica del *flow sorting*, a partire da linee aneuploidi (linee aventi una variazione nel numero dei cromosomi, rispetto a quello che normalmente caratterizza le cellule di un individuo della stessa specie). L'utilizzo di singoli bracci cromosomici ha consentito di attribuire in modo certo i geni a ciascun cromosoma evitando i problemi connessi con la presenza di sequenze omeologhe. Attraverso questo lavo-

ro, nel frumento tenero sono stati identificati oltre 120.000 geni distribuiti sui tre genomi, un numero di gran lunga superiore a quello della maggior parte delle specie coltivate che in genere hanno tra i 30 ed i 50.000 geni.

Dopo la pubblicazione della prima bozza del genoma è iniziato un lavoro volto al completamento della sequenza del genoma di frumento tenero che si prevede di terminare entro il corrente anno. Parallelamente sono in corso progetti internazionali per il sequenziamento del genoma del farro selvatico (il progenitore dei frumenti) e del frumento duro, quest'ultimo con coordinamento italiano.

Tutti i progetti di sequenziamento dei genomi fanno riferimento ad una specifica varietà, Chinese Spring nel caso del frumento tenero, e conseguentemente non consentono di rivelare l'intera diversità genetica della specie. Per questo motivo parallelamente al sequenziamento si sviluppano progetti dedicati all'identificazione di polimorfismi (marcatori molecolari) e/o al ri-sequenziamento di collezioni di germoplasma.

Per il frumento sono oggi disponibili sistemi denominati *array* per l'analisi contemporanea di decine o centinaia di migliaia di marcatori SNP (Single Nucleotide Polymorphism) che stanno rivoluzionando il modo con cui si analizza la diversità genetica e si identificano marcatori associati a geni utili. Il primo SNP array dedicato al frumento è stato prodotto da Illumina nel 2013 (Cavanagh *et al.*) con circa 9.000 SNP, seguito nel 2014 (Wang *et al.*, a) da un array contenente circa 90.000 SNP (Wheat iSelect SNP array). Successivamente la ditta Affymetrix ha reso disponibile due SNP array con 35.000 o 800.000 SNP di frumento ([http://www.affymetrix.com/catalog/prod850001/AFFY/Axiom%26%23174%3B-Wheat-Genotyping Arrays#1_1](http://www.affymetrix.com/catalog/prod850001/AFFY/Axiom%26%23174%3B-Wheat-Genotyping%20Arrays#1_1)). Questi array seppur disegnati su frumento tenero, sono utilizzabili anche per

il frumento duro. Mentre l'uso di SNP array consente di evidenziare le relazioni filogenetiche tra i genotipi analizzati, un maggior dettaglio nella definizione delle differen-

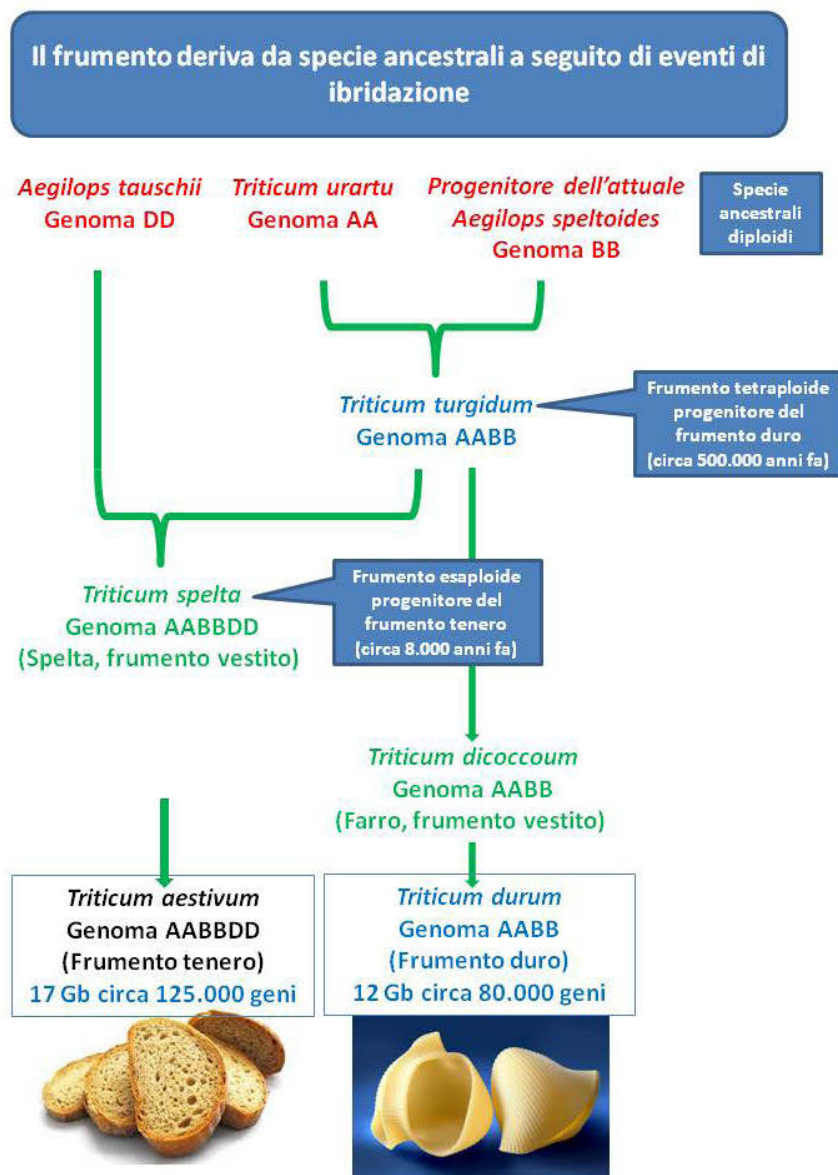


Figura 1. Origine dei frumenti.

ze genetiche si può ottenere tramite il ri-sequenziamento di interi genomi, nel riso ed in altre specie questo lavoro è già stato fatto, mentre per il frumento questo sarà uno degli obbiettivi dei prossimi anni.

La conoscenza del genoma e l'uso dei marcatori molecolari permettono di analizzare la diversità genetica, identificare ed isolare geni responsabili di importanti caratteri agronomici, sviluppare programmi di selezione genomica o, più semplicemente di selezionare mediante marcatori molecolari.

Identificazione di geni per i principali caratteri

Moltissimi lavori sono stati condotti in frumento per identificare marcatori molecolari associati a specifici caratteri quantitativi o qualitativi (per una visione complessiva dei dati disponibili si può fare riferimento a <http://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>; <http://wheat.pw.usda.gov/GG3/>), tuttavia solo in pochi casi si è giunti sino all'isolamento dei geni responsabili dei caratteri. Ad oggi, poco più di 30 geni che controllano caratteri rilevanti per qualità, produttività, resistenza a malattie, adattamento all'ambiente sono stati clonati in frumento.

La qualità dei prodotti alimentari a base di frumento è connessa alla composizione delle proteine di riserva del seme (glutine), all'attività della polifenolossidasi (PPO) e della lipossigenasi (LOX), al contenuto di carotenoidi (il pigmento giallo della farina e della semola), alla durezza della cariosside, e alle proprietà dell'amido. Nel complesso per questi caratteri sono stati clonati 16 loci con 62 diverse varianti alleliche.

La quantità e la struttura delle proteine contenute nella cariosside del grano sono i fattori principali che determinano l'attitudine delle farine e delle semole a produrre pane e pasta di buona qualità.

Da queste proteine dipende anche il valore dietetico e nutrizionale del frumento. Le proteine della cariosside con maggiore impatto sulle caratteristiche qualitative del grano sono le prolamine (proteine di riserva) ed alcune "proteine solubili" legate all'amido. Le prolamine includono le gliadine e le glutenine che rappresentano circa l'80% delle proteine totali del seme e formano il glutine, una massa proteica elastica, appiccicosa e traslucida responsabile in larga misura delle proprietà reologiche degli impasti ottenuti dal macinato di grano e della qualità panificatoria e pastificatoria.

La caratterizzazione genetica e molecolare delle prolamine realizzata nell'ultimo decennio dello scorso secolo

ha avuto un grande impatto nel miglioramento genetico delle proprietà viscoelastiche delle farine e delle semole di grano. Le glutenine a loro volta si dividono in due gruppi principali: la sub-unità ad alto peso molecolare (HMW-GS, codificata dal gene *Glu-1* sul braccio lungo dei cromosomi del gruppo di omeologia 1) e la sub-unità a basso peso molecolare (LMW-GS, codificata dal gene *Glu-3* sul braccio corto del medesimo gruppo) (Luo *et al.*, 2001).

La composizione della glutenina, soprattutto quella della frazione HMW-GS, conferisce resistenza, elasticità ed estensibilità del glutine. La variazione allelica del gene per la HMW-GS è strettamente associata alla qualità del prodotto finale nel frumento tenero.

Anche il pigmento giallo della granella è un importante parametro qualitativo sia nel frumento tenero che nel frumento duro, e richiede livelli specifici differenti. Esso si risolve nel colore del semolino a sua volta correlato al colore della pasta nel frumento duro, e del pane nel frumento tenero. I consumatori tradizionalmente associano il colore giallo brillante della pasta ad una più elevata qualità, mentre per il pane è preferibile un colore che va dal bianco al color crema.

I carotenoidi sono i principali componenti del pigmento giallo: essi vengono sintetizzati attraverso un complesso processo che coinvolge più di 10 enzimi, e tra questi la Fitoene Sintasi (PSY) è considerato un fattore chiave, limitando la velocità di sintesi dei carotenoidi. Diversi geni PSY sono stati identificati in frumento, ma è il gene *Psy1* localizzato sul gruppo omeologo 7 ad essere associato al contenuto di pigmento giallo (Wang *et al.*, 2009).

La durezza della cariosside è controllata dal locus *Ha* localizzato sul braccio corto del cromosoma 5D codificante proteine solubili coinvolte nella definizione della tessitura della cariosside (*Puroindoline a* e *b*, e *Grain Softness Protein*) con importanti effetti sulla resa in macinazione, sulle caratteristiche reologiche delle farine e conseguentemente sulla qualità pastificatoria e panificatoria (Morris *et al.*, 2002). Il frumento tenero con cariosside dura (noto anche come grano *hard*) richiede più acqua e un tempo doppio di condizionamento prima della macinazione rispetto al frumento tenero con cariosside soffice e farinosa (*soft*). Inoltre la farina del frumento "hard" ha un assorbimento idrico più elevato. Le varietà di grano duro hanno sempre cariossidi particolarmente dure.

Per quanto riguarda i caratteri di importanza agronomica, ad oggi sono stati clonati 12 loci con 22 alleli. Essi comprendono l'altezza della pianta, la risposta al fotoperiodo, il peso della granella e la tolleranza agli stress abiotici.

I geni del semi-nanismo *Rht-B1b* (*Rht1*) e *Rht-D1b* (*Rht2*) largamente presenti nelle varietà commerciali riducono l'altezza della pianta, aumentano l'harvest index (rapporto tra il peso dei semi e della biomassa totale), migliorano la resistenza all'allettamento, e di conseguenza aumentano la resa.

L'adattamento delle varietà di frumento tenero alle diverse condizioni ambientali è largamente influenzata dal periodo di fioritura, principalmente determinato da tre gruppi di geni: geni che controllano la risposta al fotoperiodo (*Ppd*), geni della vernalizzazione (*Vrn*) e geni legati alla velocità dello sviluppo (Yang *et al.*, 2009).

Durante la passata decade, sono stati clonati diversi geni per la resistenza alle malattie del frumento (Liu *et al.*, 2012). Tra questi, di grande rilievo il locus *Pm3* per la resistenza all'oidio, il locus *Lr34/Yr18/Pm38* per la resistenza alla ruggine bruna, la ruggine gialla e l'oidio, e il gene *Sr33* che conferisce resistenza a diverse razze di ruggine nera incluso un ceppo di fungo particolarmente aggressivo che minaccia fortemente la sicurezza alimentare, denominato Ug99 (Periyannan *et al.*, 2013).

Marker Assisted Selection in frumento

L'utilizzo combinato di metodi di breeding classico, basato sulla selezione visiva seguita da specifici test fenotipici, con le conoscenze genomiche e la bioinformatica offre nuove opportunità per accelerare lo sviluppo di varietà di frumento più performanti e con specifici tratti qualitativi.

Ad oggi infatti, la selezione di specifici caratteri può essere accelerata e semplificata grazie alla *Marker Assisted Selection* (MAS o selezione assistita con marcatori molecolari), nella quale marcatori molecolari associati a geni di interesse vengono usati per selezionare le migliori combinazioni geniche nelle generazioni segreganti. Con questa tecnica è possibile seguire la segregazione dei singoli geni introdotti attraverso incroci nel processo di miglioramento genetico tramite un approccio che è indipendente dalle condizioni ambientali, e dalla presenza o meno delle malattie, nel caso, ad esempio, in cui si stia seguendo un gene di resistenza. Inoltre la MAS può aumentare l'accuratezza del miglioramento genetico permettendo la selezione di un carattere basandosi su una singola pianta, facilitando la selezione e la fissazione contemporanea di diversi geni, permettendo la selezione di geni recessivi e dominanti senza ricorrere a caratterizzazione fenotipica ad ogni generazione e massimizzando o minimizzando la diversità dei parentali scelti per l'incrocio.

L'impiego della MAS in frumento è stato a lungo tempo limitato dalla mancanza di marcatori molecolari e di sistemi di genotipizzazione efficienti ed economicamente convenienti. Oggi questi problemi sono definitivamente risolti ed esistono diverse tecnologie di genotipizzazione ad elevata processività e basso costo. In presenza di geni isolati è possibile sviluppare marcatori funzionali, capaci di discriminare in modo accurato gli alleli per un determinato gene. Tali marcatori sono ideali per la MAS e ad oggi ne sono stati sviluppati 97 che consentono di identificare 93 alleli basati sulle sequenze dei geni che in gran parte fanno riferimento ai geni descritti nel paragrafo precedente.

La MAS in frumento è oggi ampiamente utilizzata per se-

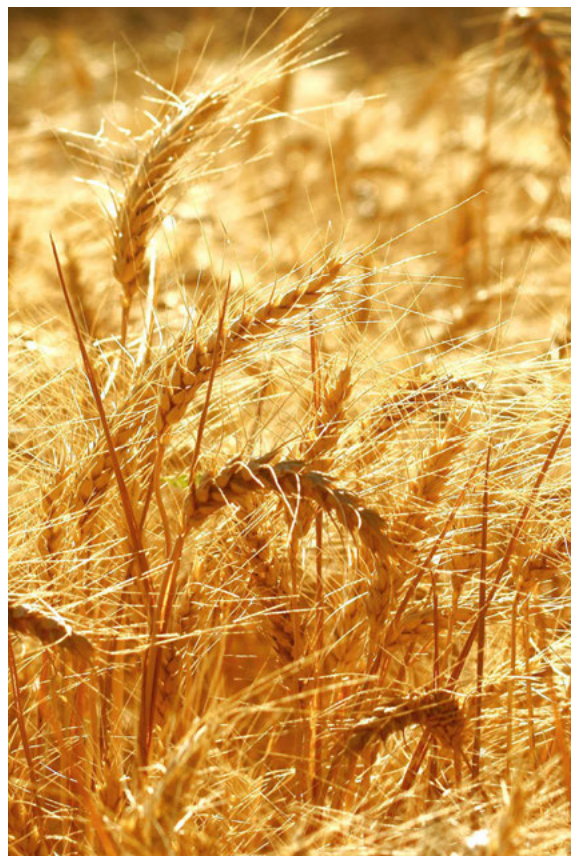


Figura 2. La MAS in frumento viene utilizzata per selezionare caratteri qualitativi, resistenza a malattie, caratteri di natura agronomica

	Caratteri	Geni clonati	Referenze
Qualità	forza del glutine	<i>Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1, Glu-A3, Glu-B3</i>	Wang et al. 2009b, Liu et al. 2008, Ragupathy et al. 2008, Wang et al. 2010
	contenuto proteico	<i>Gpc-B1</i>	Distelfeld et al. 2007
	durezza della granella	<i>Pin-a, Pin-b</i>	Chen et al. 2012, Giroux and Morris 1997
	pigmento giallo della granella	<i>Psy-D1</i>	Wang et al. 2009a
	qualità dell'amido	<i>Waxy-B1</i>	Saito et al. 2009
Caratteri agronomici	tolleranza alla siccità	<i>Dreb-B1</i>	Wei et al. 2009
	geni della bassa taglia	<i>Rht-B1, Rht-D1</i>	Ellis et al. 2002
	vernalizzazione	<i>VRN-A1, VRN-B1, VRN-D1, VRN-B3, VRN-H1</i>	Fu et al. 2005, Chu et al. 2011, Yan et al. 2006
	risposta al fotoperiodo	<i>Ppd-D1</i>	Beales et al. 2007
	peso della granella	<i>TaSus2-2B, TaGW2-6A, TaCwi-A1</i>	Jiang et al. 2011, Su et al. 2011, Ma et al. 2012
Resistenza a malattie	complesso delle ruggini: gialla, bruna, nera	<i>Lr34/Yr18/Pm38, Ug99</i>	Lagudah et al. 2009, Periyannan et al. 2013
	oidio	<i>Pm3, Lr34/Yr18/Pm38</i>	Tommasini et al. 2006, Lagudah et al. 2009

Tabella 1. Principali geni clonati in frumento e per i quali sono disponibili marcatori localizzati all'interno dei geni capaci di identificare i diversi alleli.

lezionare caratteri qualitativi, resistenze a malattie inclusa la fusariosi della spiga che causa l'accumulo di micotossine, e svariati caratteri di natura agronomica (Tabella 1). I marcatori associati a geni di resistenza alle malattie sono quelli più diffusamente utilizzati. Ad esempio, nel caso della ruggine bruna sono noti più di 60 tra geni e loci che conferiscono resistenza. Molti di questi geni conferiscono resistenze razza specifica che nel corso di alcuni anni possono essere superate da nuove razze del patogeno. Per ottenere nuove varietà con buoni livelli di protezione contro l'elevata pressione della malattia, è quindi necessario utilizzare complessi genici capaci di conferire resistenza contro molti patotipi dello stesso patogeno, rallentando la progressione della malattia (*slow rusting genes*).

Lr34 (Singh et al., 2003) e *Lr46* (Martínez et al., 2001) fanno parte di questa categoria: essi infatti forniscono una resistenza durevole e non specifica alla ruggine bruna anche se il loro effetto è minore rispetto ai geni razza-specifici. L'introgressione di *Lr34* nelle varietà coltivate è particolarmente interessante in quanto nello stesso locus sono presenti altri geni che conferiscono resistenza ad altri patogeni, in particolare: *Yr18* che conferisce resistenza alla ruggine gialla nella pianta adulta, *Pm38* attivo nella resistenza all'oidio e *Ltn1* che conferisce resistenza alla necrosi della punta della foglia (Krattinger et al., 2009). Una

simile associazione è stata osservata anche per *Lr46* e *Yr29*, anch'essi *slow rusting genes* per le ruggini bruna e gialla.

È anche possibile utilizzare *slow rusting genes* a complemento di quelli razza specifici. Inoltre, la disponibilità di numerosi marcatori associati a tali geni facilita di gran lunga il processo di piramidizzazione, ovvero il processo di combinazione simultanea di più geni in un singolo genotipo, al fine di sviluppare una resistenza duratura efficace verso un ampio spettro di razze del patogeno.

Informazioni aggiornate sui marcatori disponibili in frumento e sui protocolli per il loro utilizzo sono disponibili al sito: <http://maswheat.ucdavis.edu/>.

Le prospettive

La genomica sta rivoluzionando le tecniche del miglioramento genetico. Anche nel frumento, seppur più lentamente di altre specie a causa della complessità del suo genoma, le conoscenze genomiche stanno entrando nella selezione varietale. La disponibilità del genoma favorirà l'isolamento di molti altri geni utili per i quali verranno resi disponibili i corrispondenti marcatori.

La MAS è ormai routinaria almeno nelle grandi industrie sementiere e nell'immediato futuro la grande disponibilità di marcatori molecolari a basso costo aprirà la strada alla selezione genomica, ovvero la selezione delle piante migliori basata sulla misura del loro potenziale genetico (Bassi et al. 2016), dando un'ulteriore accelerazione al lavoro di miglioramento genetico di questa importantissima specie coltivata.

Bibliografia

- Bassi FM, Bentley AR, Charmet G, Ortiz R, Crossa J. Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Science*, 2016, 242:23-36.
- Beales J, Turner A, Griffiths S, Snape JW, Laurie DA. A

- pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 115:721–733.
- Cavanagh CR, Chao S, Wang S, Huang BE, Stephen S, Kiani S, Forrest K, Saintenac C, Brown-Guedira GL, Akhunova A, See D, Bai G, Pumphrey M, Tomar L, Wong D, Kong S, Reynolds M, da Silva ML, Bockelman H, Talbert L, Anderson JA, Dreisigacker S, Baenziger S, Carter A, Korzun V, Morrell PL, Dubcovsky J, Morell MK, Sorrells ME, Hayden MJ, Akhunov E. Genome-wide comparative diversity uncovers multiple targets of selection for improvement in hexaploid wheat landraces and cultivars. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United State of America*, 2013, 110:8057–8062.
 - Chen F, Zhang FY, Xia XC, Dong ZD, Cui DQ. Distribution of puroindoline alleles in bread wheat cultivars of the Yellow and Huai valley of China and discovery of a novel puroindoline a allele without PINA protein. *Molecular Breeding*, 2012, 29:371–378.
 - Distelfeld A, Fahima T. Wild emmer wheat as a source for high-grain-protein genes: map-based cloning of Gpc-B1. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2007, 55:297–306.
 - Ellis MH, Spielmeier W, Gale KR, Rebetzke GJ, Richards RA. “Perfect” markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105:1038–1042.
 - Fu DL, Szücs P, Yan LL, Helguera M, Skinner JS, Zitzewitz JV, Hayes PM, Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in VRN-1 are associated with spring growth habit in barley and wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 2005, 273:54–65.
 - Giroux MJ, Morris CF. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch-surface friabilin. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95:857–864.
 - International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC). A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science*, 2014, 345:1251788.
 - Jiang QY, Hou J, Hao CY, Wang LF, Ge HG, Dong YS, Zhang XY. The wheat (*T. aestivum*) sucrose synthase 2 gene (TaSus2) active in endosperm development is associated with yield traits. *Functional and Integrative Genomics*, 2011, 11:49–61.
 - Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 2009, 323:1360–1363.
 - Lagudah ES, Krattinger SG, Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, Spielmeier W, Brown-Guedira G, Selter LL, Keller B. Gene-specific markers for the wheat gene Lr34/Yr18/ Pm38 which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119:889–898.
 - Liu SX, Chao SM, Anderson JA. New DNA markers for high molecular weight glutenin subunits in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 118:177–183.
 - Liu Y, He Z, Appels R, Xia X. Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 125 (1): 1–10.
 - Luo C, Griffin WB, Branlard G, McNeil DL. Comparison of low- and high- molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102:1088–10.
 - Ma DY, Yan J, He ZH, Wu L, Xia XC. Characterization of a cell wall invertase gene TaCwi-A1 on common wheat chromosome 2A and development of functional markers. *Molecular Breeding*, 2012, 29:43–52.
 - Martínez F, Niks RE, Singh RP, Rubiales D. Characterization of Lr46, a gene conferring partial resistance to wheat leaf rust. *Hereditas*, 2001, 135:111–114.
 - Morris CF. Puroindolines: the molecular basis of wheat grain hardness. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 633–647.
 - Periyannan S, Moore J, Ayliffe M, Bansal U, Wang X, Huang L, Deal K, Luo M, Kong X, Bariana H, Mago R, McIntosh R, Dodds P, Dvorak J, Lagudah E. The gene Sr33, an ortholog of barley Mla genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. , 2013, 16; 341(6147):786–8.
 - Ragupathy R, Naeem HA, Reimer E, Lukow OM, Sapirstein HD, Cloutier S. Evolutionary origin of the segmental duplication encompassing the wheat GLU-B1 locus encoding the overexpressed Bx7 (Bx7OE) high molecular weight glutenin subunit. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 116:283–296.
 - Saito M, Vrinten P, Ishikawa G, Graybosch R, Nakamura T. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs. *Molecular Breed*, 2009, 23:209–217.
 - Singh RP, Huerta-Espino J. Effect of leaf rust resistance gene Lr34 on components of slow rusting at seven growth stages in wheat. *Euphytica*, 2003, 129:371–376.
 - Su ZQ, Hao CY, Wang LF, Dong YC, Zhang XY. Identification and development of a functional marker of TaGW2 associated with grain weight in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122:211–223.
 - Tommasini L, Yahiaoui N, Srichumpa P, Keller B. Development of functional markers specific for seven Pm3 resistance alleles and their validation in the bread wheat gene pool. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 114:165–175. <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-006-0420-1>
 - Wang JW, He XY, He ZH, Wang H, Xia XC. Cloning and phylogenetic analysis of phytoene synthase 1 (Psy1) genes in common wheat and related species. *Hereditas*, 2009a, 146:208–256.
 - Wang LH, Zhao XL, He ZH, Ma W, Appels R, Peña RJ, Xia XC. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit Glu-B3 genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2009b, 118:525–539.
 - Wang LH, Li GY, Peña RJ, Xia XC, He ZH. Development of STS markers and establishment of multiplex PCR for Glu-A3 alleles in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Cereal Science*, 2010, 51:305–312.
 - Wang S, Wong D, Forrest K, Allen A, Chao S, Huang BE, Maccaferri M, Salvi S, Milner SG, Cattivelli L, Mastrangelo AM, Whan A, Stephen S, Barker G, Wieseke R, Plieske J, International Wheat Genome Sequencing Consortium, Lillemo M, Mather D, Appels R, Dolferus R, Brown-Guedira G, Korol A, Akhunova A, Feuillet C, Salse J, Morgante M, Pozniak C, Luo M-C, Dvorak J, Morell M, Dubcovsky J, Ganai M, Tuberosa R, Lawley C, Mikoulitch I, Cavanagh C, Edwards KJ, Hayden M, Akhunov E. Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90 000 single nucleotide polymorphism array. *Plant Biotechnol Journal*, 2014, 12(6): 787–796.
 - Wei B, Jing RL, Wang CS, Chen JB, Mao XG, Chang XP, Jia JZ. Drebl genes in wheat (*Triticum aestivum* L.): development of functional markers and gene mapping based on SNPs. *Molecular Breeding*, 2009, 23:13–22.
 - Yan LL, Fu DL, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene VRN3 is an orthologue of FT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103:19581–19586.
 - Yang FP, Zhang XK, Xia XC, Laurie DA, Yang WX, He ZH. Distribution of the photoperiod insensitive Ppd-D1a allele in Chinese wheat cultivars. *Euphytica*, 2009, 165:445–45.

Ibridi di orzo: problematiche e realizzazioni

Avviate oltre mezzo secolo fa, le ricerche sullo sfruttamento dell'eterosi solo recentemente hanno portato alla diffusione di ibridi commerciali. Tale realizzazione è stata resa possibile dall'impiego di una maschio-sterilità genetico-citoplasmatica e di idonee tecniche di produzione del seme ibrido. L'affermazione di queste costituzioni dipenderà, oltre che dall'entità dell'espressione eterotica, dall'adozione di specifiche tecniche agronomiche.

Enrico Noli, Sergio Conti

Barley hybrids: issues and achievements

The success of hybrid varieties depends on the economic advantages achievable with them compared to traditional varieties, and on the availability of a cost-effective mechanism to promote cross-pollination, a crucial aspect in a strictly autogamous species such as barley. A genetic male-sterility system, based on the use of a balanced tertiary trisomic (BTT), was initially adopted, even though on a limited scale, but it was abandoned after a few years due to the high cost for parent reproduction. A more suitable system, relying on a genetic-cytoplasmic male-sterility derived from a wild barley accession, was later implemented, making seed production reliable and competitive and therefore allowing the spread of hybrids in several European countries. These achievements were also possible by applying the strategy of "mix planting" parental lines in hybrid seed production fields in order to attain a high level of hybridization. On the legislative side, however, the adoption of this solution required the lowering of genetic purity standards for certified seed. Hybrid varieties can be superior to pure lines in terms of yield, yield stability and resistance to biotic and abiotic stresses, provided that suitable agronomic techniques are applied.

Il successo commerciale delle varietà ibride dipende dai vantaggi economici conseguibili dagli agricoltori e dalle ditte sementiere, rispetto alle tradizionali cultivar.

Per il loro impiego è pregiudiziale la rispondenza ad una serie di esigenze che includono, da un lato, la maggiore produttività, stabilità della resa, resistenza agli stress biotici ed abiotici rispetto alle varietà tradizionali, dall'altro la disponibilità di sistemi biologici e tecnici per una produzione sementiera economicamente sostenibile.

Quest'ultimo aspetto è cruciale per una specie come l'orzo, dato il sistema riproduttivo strettamente autogamo, le alte densità di semina della coltura e il valore modesto della PLV, che richiedono la produzione di elevate quantità di seme F₁ a prezzi contenuti.

D'altra parte, le ragioni dell'interesse dell'industria sementiera per questo tipo di costituzione sono ovvie data la non convenienza, per gli agricoltori, del reimpiego di seme aziendale (Longin *et al.*, 2012).

L'aspetto preliminare da risolvere per rendere perseguibile un tale obiettivo riguarda la disponibilità di sistemi efficaci per il controllo della fecondazione incrociata, mentre la convenienza dell'impiego degli ibridi dipenderà dal rapporto tra incremento della PLV con essi ottenibile e aumento dei costi del seme rispetto alle cultivar tradizionali.

Controllo della sterilità pollinica

L'elevata autogamia della specie rende imprescindibile la disponibilità di linee parentali portaseme con efficienti sistemi di sterilità maschile per prevenire l'autofecondazione, di procedure idonee alla moltiplicazione dei

maschio-sterili (m-sterili), di un grado elevato di impollinazione incrociata e di una completa ristorazione della fertilità nella generazione F₁.

La prima segnalazione di un gene nucleare recessivo per la m-sterilità in orzo si deve a Suneson (1940); l'aspetto problematico del suo impiego, come di numerosi altri geni simili, deriva dalla riproduzione dello stock m-sterile (*ms/ms*), possibile attraverso l'incrocio con una linea isogenica eterozigote (*Ms/ms*) da cui tuttavia si ottiene una popolazione segregante costituita per metà da m-fertili.

La loro eliminazione, da effettuarsi in fase precedente la fioritura, sarebbe economicamente possibile se il gene per la m-sterilità fosse strettamente linked ad un gene recessivo (*r*) per la resistenza ad un fitocida; i segreganti m-fertili sensibili (*Ms-R/ms-r*) verrebbero in tal modo eliminati con il trattamento e i restanti sterili (*ms-r/ms-r*) rappresenterebbero il portaseme dell'ibrido (Fig. 1).

Un approccio di questo tipo è quello descritto da Wiebe (1960) che ha proposto come fitocida il DDT, assumendo la possibilità di reperire nella variabilità naturale della specie, o costruire con procedure citogenetiche, uno stretto linkage tra geni per la sterilità pollinica e per la resistenza. La messa al bando del DDT, oltre all'insufficiente livello di linkage trovato (Wiebe, 1964), hanno tuttavia reso impraticabile la proposta.

Ramage (1965), propose l'uso di un sistema trisomic terziario bilanciato (BTT) in cui la m-sterilità è controllata da un gene recessivo (*ms*) ed il mantenimento della linea portaseme è permesso dalla presenza dell'allele dominante per la m-fertilità (*Ms*) sito in un cromosoma sopran-

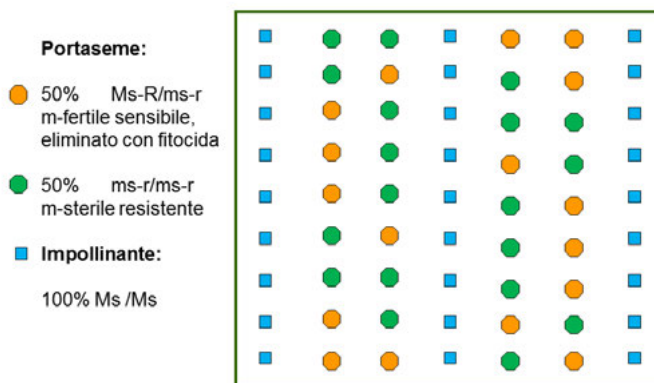


Figura 1. Ipotesi di preparazione di un ibrido commerciale con l'utilizzo della maschio-sterilità nucleare linked ad un marcatore per la resistenza recessiva ad un fitocida. Per non danneggiare con il trattamento fitocida le file dell'impollinante sarebbe necessaria la loro schermatura o l'uso di una linea resistente (Ms-r/Ms-r).

numerario; quest'ultimo, ottenuto per traslocazione, è costituito da due frammenti di cromosomi non omologhi (trisomico terziario), in uno dei quali, strettamente linked al punto di giunzione, è posto all'allele Ms (Fig. 2).

A seguito della meiosi il BTT forma tre tipi di gameti femminili: aploidi *ms* (circa 70%), aneuploidi *Ms/ms* (circa 30%) e in misura trascurabile (<1%) aneuploidi *ms/ms*, mentre non si formano gameti aploidi vitali *Ms* per deficienza cromosomica del soprannumerario; i rapporti tra le tre classi genotipiche funzionali derivano dalla disgiunzione preferenziale dei due cromosomi normali e dalla minore possibilità di trasmissione del cromosoma soprannumerario.

I gameti maschili, a loro volta, sono solo aploidi *ms* poiché i cromosomi soprannumerari non sono trasmessi per via maschile. Pertanto con l'autofecondazione si ottengono essenzialmente due classi di segreganti: per il 70% *ms/ms* (m-sterili) e per il 30% *ms/ms/Ms* (BTT, m-fertili). Le piante trisomiche, caratterizzate da minor vigore, maggiore tardività e capacità competitiva inferiore rispetto alle diploidi, possono essere precocemente distinte, in fase di plantula, per la forma della foglia più lunga e stretta (Ramage, 1983).

La riproduzione del BTT può, pertanto, essere realizzata in coltura a bassa densità di semina provvedendo tempestivamente all'eliminazione manuale dei diploidi; nella produzione dell'ibrido commerciale, al contrario, il portaseme è coltivato a densità di semina superiori che favoriscono la competizione tra le due classi determinando l'eliminazione quasi totale delle piante trisomiche m-fertili.

I limiti di tale sistema derivano dai costi molto elevati, in fase di riproduzione del BTT, per l'eliminazione dei tipi diploidi, la cui identificazione non è sempre agevole nei materiali più vigorosi. Ibridi commerciali ottenuti con la tecnica BTT hanno avuto diffusione in Arizona, anche se su superfici molto limitate (12.000-20.000 ha/anno); facevano infatti difetto a quelle costituzioni la resistenza all'allettamento e alla *Claviceps purpurea*. Dal 1978, con l'introduzione di nuove cultivar omozigoti a bassa taglia, elevata produttività e resistenti all'allettamento, gli ibridi di orzo sono spariti dal mercato sementiero (Ramage, 1983).

Nonostante molti problemi connessi con l'impiego del BTT siano stati risolti, l'esperienza acquisita con numerose colture indica come più facilmente gestibili altri sistemi, e soprattutto la m-sterilità a controllo genetico-citoplasmatico (CMS).

Seguendo una linea di ricerca già percorsa con successo per il frumento in Giappone e negli USA (Noli e Conti, 2016), una procedura per l'ottenimento di sistemi di sterilità pollinica e ristorazione della m-fertilità consiste nella sostituzione del citoplasma della specie coltivata con altro di origine diversa e nel reperimento, all'interno di quest'ultima, dei geni ristoratori. Schooler (1967) ottenne, a seguito di una serie di incroci interspecifici, una m-sterilità alloplasmica indotta dal citoplasma di *Hordeum jubatum* L. non utilizzabile, tuttavia, per gli effetti negativi sulle caratteristiche agronomiche e per la mancanza di geni ristoratori. Risultati positivi sono stati, al contrario, ottenuti da Ahokas (1979) con una accessione di *Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* (progenitore selvatico dell'orzo coltivato; Fig. 3), originaria dell'alta Galilea (Israele), risultata una fonte di citoplasma m-sterile (denominata *msm1*) priva di effetti negativi sulla fertilità femminile e sui caratteri agronomici, e provvista di un gene dominante ristoratore (*Rfm1a*). Una seconda fonte di m-sterilità citoplasmatica è stata individuata dallo stesso autore (Ahokas, 1982) in una diversa accessione di *H. spontaneum* proveniente dalle pianure costiere meridionali di Israele.

Nonostante la disponibilità di una CMS efficace e più idonea alla produzione sementiera rispetto ai precedenti sistemi, non vi è stato un interesse alla realizzazione di costituzioni ibride da parte delle istituzioni di ricerca pubbliche USA (Mühleisen *et al.*, 2013).

Nel 1994 un breeder della New Farm Crops, Ltd. (ora Syngenta Seed) avviò in modo sistematico lo sviluppo di ibridi inserendo questo sistema CMS in materiale genetico europeo di tipo tetrastico. Il primo ibrido commerciale così ottenuto è stato rilasciato nel UK nel 2002; diversi

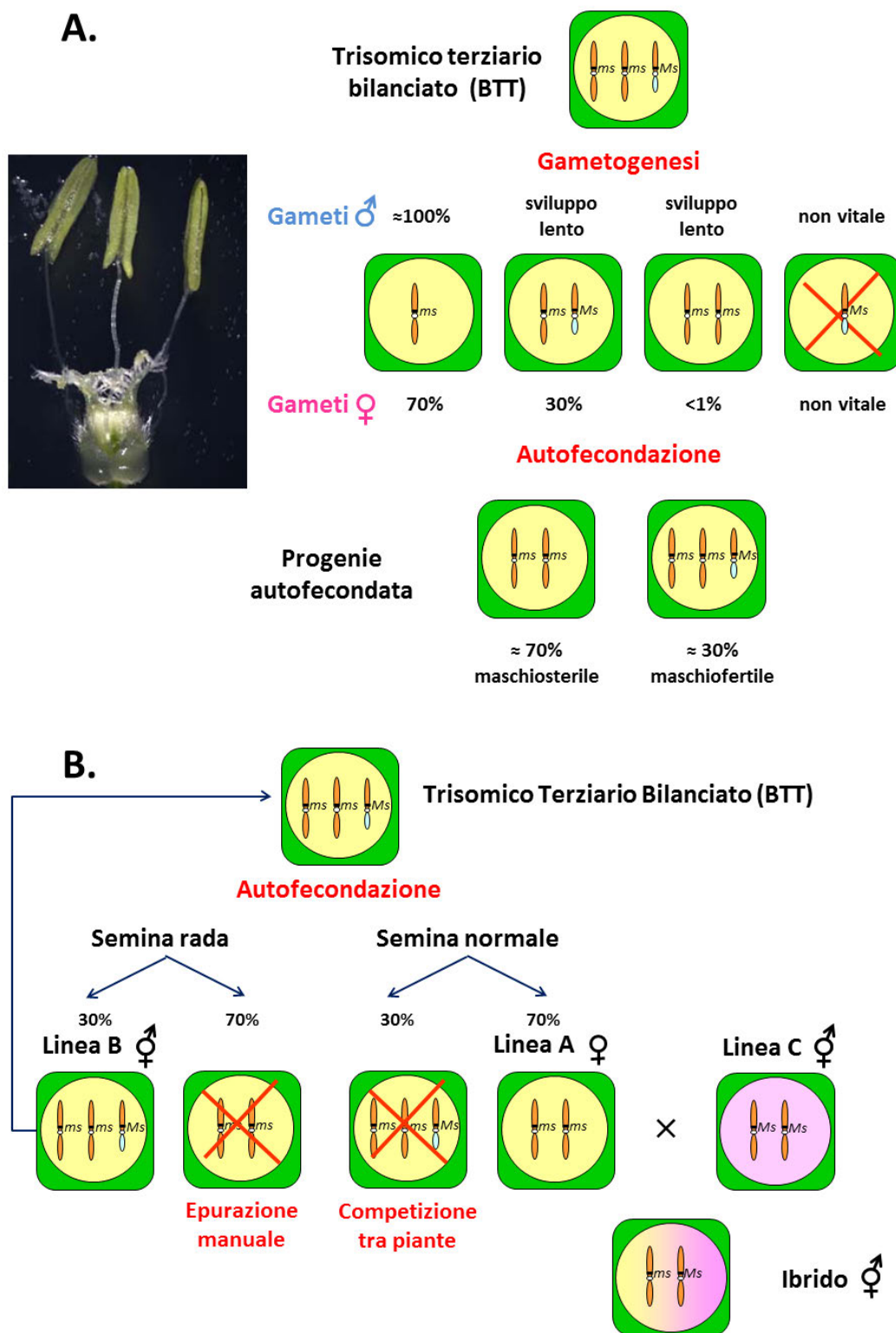


Figura 2. Utilizzo di un sistema trisomico terziario bilanciato (BTT). A) La gametogenesi femminile produce gameti aploidi (≈70%) e gameti disomici con cromosoma soprannumerario traslocato (≈30%); i gameti disomici primari sono molto rari (<1%) e quelli monosomici con cromosoma traslocato non sono vitali. La gametogenesi maschile produce quasi esclusivamente gameti aploidi normali, mentre i gameti disomici anomali non contribuiscono alla fecondazione. B) Mantenimento del BTT e produzione dell'ibrido: in semina rada è possibile individuare ed eliminare i maschiosterili diploidi sulla base della dimensione delle foglie, mentre in semina a densità normale per la produzione dell'ibrido commerciale i BTT sono eliminati dalla competizione del maschiosterile.



Figura 3. *Hordeum vulgare ssp. spontaneum*, particolare della spiga (foto Sara Milner).

altri ne sono quindi seguiti fino a raggiungere, nel 2012 in Europa, una superficie coltivata di oltre 200.000 ha, concentrati soprattutto in Germania, Francia e UK (Longin *et al.*, 2012); in Italia la superficie coltivata con ibridi si aggira attualmente sui 18.000 ha.

Tecnica di produzione sementiera

Un aspetto di rilevante importanza per una produzione di ibridi a costi relativamente contenuti è rappresentato dalla quantità di seme ottenibile in fase di ibridazione.

Il sistema riproduttivo dell'orzo è, infatti, caratterizzato da meccanismi morfo-fisiologici atti a favorire l'autofecondazione: fiori ermafroditi, deiscenza delle antere antecedente o coincidente con l'apertura dei fiori, scarso sviluppo degli stigmi e delle antere con limitata produzione di polline.

Una stretta autogamia si riscontra nelle varietà primaverili a prevalente cleistogamia (fecondazione a fiore chiuso), mentre nei tipi invernali la fecondazione a fiore aperto può permettere una limitata allogamia. Il successo dell'ibridazione su portasemi m-sterili dipende dalla quantità di polline prodotto e dalla sua dispersione nello spazio, dalla durata dell'antesi dell'impollinante, dalla vitalità del polline (Parzies *et al.*, 2005) e dalla durata della recettività degli stigmi del portaseme.

Sono favorevoli all'ibridazione un'ampia divaricazione delle glumelle, così come la dimensione ed il grado di estrusione degli stigmi e delle antere, caratteri influenzati sia da fattori genetici che ambientali (Abdel-Ghani *et al.*, 2005). La notevole variabilità genetica tra livelli di fe-

condazione incrociata riscontrabile in letteratura (Hayes, 1968; Campbell e Kasha, 1981; Scholz e Künzel, 1982) indica la possibilità di migliorare, con la selezione, il grado di allogamia agendo sia su linee parentali portasemi che impollinanti (Foster e Fothergill, 1982).

La scarsa dispersione del polline, tuttavia, richiederebbe nei campi di ibridazione, in cui le linee parentali sono coltivate in strisce alternate, rapporti tra superfici dedicate all'impollinante e al portasemi piuttosto alti, con conseguente limitata produzione areica di seme ibrido.

Una soluzione atta a favorire l'ibridazione, e quindi a limitarne i costi, consiste nella semina di un miscuglio di seme delle linee parentali ("mixed planting") secondo rapporti idonei a rendere massima la produzione di seme F₁, riducendo quanto più possibile, nel prodotto finale, la presenza di seme proveniente da autofecondazione dell'impollinante.

Al riguardo, Syngenta prevede miscugli tra piante portasemi e impollinanti dell'ordine del 95% e 5%, rispettivamente (http://www.canbar6.usask.ca/files/32_Phillips2.pdf). La tecnica, già utilizzata nella produzione di ibridi di segale, presenta due vantaggi rispetto alla semina a strisce separate: maggiore produzione areica, dovuta alla riduzione della superficie destinata all'impollinante, e più alti livelli di impollinazione incrociata, conseguente alla stretta contiguità tra piante delle linee parentali (Kempe e Gils, 2011). Rispetto alla segale, specie allogama, l'orzo è al riguardo svantaggiato dalla minore produzione di polline, mentre è avvantaggiato dalla minore dimensione del granulo pollinico che ne favorisce la dispersione nello spazio circostante.

Sono comunque rilevanti, ai fini di un esito positivo, la scelta di un impollinante di taglia superiore al portasemi e la sincronia di fioritura delle linee parentali (Australian Government, 2008).

I lotti di seme ibrido di orzo ottenuti con la tecnica "mixed planting" generalmente contengono meno del 10% di seme derivante da autofecondazione dell'impollinante, anche se in particolari condizioni atmosferiche in fase di fioritura tale limite potrebbe essere superato.

Considerata la problematicità della produzione di seme ibrido con questa tecnica, la Commissione Europea, tenuto conto degli aspetti positivi connessi con l'impiego di varietà ibride, con direttiva del 29/10/2015, a modifica di quanto espresso nella precedente direttiva 66/402/CEE, ha fissato come purezza varietale minima, per ibridi di orzo ottenuti con CMS, l'85%. Questa direttiva è stata recepita ed è entrata in vigore nel nostro Paese il 1° luglio 2016.

L'eliminazione post-raccolta del seme contaminan-

te sarebbe possibile utilizzando attrezzature idonee a riconoscerlo e a separarlo; al riguardo va citato un procedimento brevettato (<http://www.google.com/patents/WO2012038350A1?cl=en&hl=it>) basato sul riconoscimento di differenze rilevabili tramite l'uso della luce dell'infrarosso vicino.

Caratteristiche degli ibridi

Se da un lato il contenimento del prezzo del seme, attraverso l'adozione di opportuni procedimenti produttivi, è una condizione indispensabile per un impiego delle varietà ibride, il loro successo commerciale deriverà dall'effettiva superiorità agronomica nei confronti delle tradizionali varietà omozigoti.

Elemento fondamentale al riguardo è rappresentato dall'entità dell'eterosi, espressa rispetto alla migliore linea parentale o alla migliore varietà diffusa sul mercato (eterosi commerciale) oltre ad altri aspetti quali la stabilità fenotipica, in particolare negli ambienti marginali, e la maggiore facilità di accumulo nell'ibrido di alleli dominanti favorevoli.

Piuttosto numerose sono state, negli anni compresi tra il 1940 e il 1980, le indagini sperimentali volte a indagare l'espressione dell'eterosi in orzo, anche se non molto probanti per trarre conclusioni circa l'opportunità di sviluppare ibridi commerciali.

La scarsa disponibilità di seme, ottenuto tramite laboriose ibridazioni manuali, ha reso infatti problematica la sperimentazione in tal senso, condotta generalmente su poche combinazioni di incrocio, in pochi ambienti, in parcelle molto piccole e su piante molto spaziate.

I risultati emersi, pur se talvolta contraddittori, hanno evidenziato, in diversi casi (dati riassunti da Hayes, 1968 e Ramage, 1983), significativi incrementi produttivi rispetto alle linee pure parentali. La componente della resa che in queste situazioni ha mostrato effetti dell'eterosi più rilevanti è stata l'accestimento, carattere la cui espressione è favorita da condizioni di scarsa fittezza. In condizioni di competizione simili a quelle adottate in coltura per le cultivar tradizionali, il vantaggio produttivo può risultare, in pratica, assente (Severson e Rasmusson, 1968).

L'estrinsecazione della maggiore potenzialità si manifesta, in genere, negli ambienti più siccitosi (Einfeldt *et al.*, 2005) e con minori apporti di fertilizzante azotato (Conti e Ferraresi, 1972); al riguardo è da rilevare che elevate piovosità e disponibilità di azoto favoriscono l'allettamento, caratteristica negativa espressa in maggior misura nelle costituzioni ibride, anche a causa della maggiore altezza della pianta.

In una più recente indagine (Mühleisen *et al.*, 2013) condotta in 15 ambienti, con fittezze di semina appropriate per costituzioni ibride o tradizionali, e su un ampio campione di ibridi sperimentali, linee parentali e controlli commerciali, l'incremento produttivo dei primi rispetto al migliore genitore è stato in media pari al 9,2%, con un ambito di variazione compreso tra -1,7 e 18,3 %.

L'eterosi commerciale media, riferita alla migliore varietà di controllo è stata pari al 2,7%, con un minimo di -5,2 ed un massimo del 7,6 %; si tratta di vantaggi piuttosto modesti se raffrontati a quelli conseguibili in altre colture allogame. Va comunque ricordato che le strategie di sviluppo di linee pure commerciali fino ad ora perseguite, volte ad accumulare in poche varietà geni favorevoli provenienti da materiali di origine diversa, hanno inevitabilmente ridotto la distanza genetica tra linee elite e di conseguenza il livello di eterozigosi degli ibridi derivanti.

In futuro, risultati di maggiore interesse potranno essere ottenuti adottando strategie idonee allo sviluppo di parentali geneticamente diversificati; in una tale prospettiva, notevoli vantaggi potrebbero derivare dall'utilizzo, in fase di costituzione delle popolazioni di base e nel successivo intervento selettivo, di marcatori molecolari.

Vanno d'altra parte sottolineati, tra gli aspetti positivi delle varietà ibride, la più elevata resistenza alle avversità biotiche, derivante dalla possibilità di accumulare in esse un maggior numero di alleli dominanti per la resistenza, e la maggiore stabilità fenotipica. In particolare, quest'ultima è stata evidenziata in orzo in un confronto, realizzato in 5 località, tra ibridi a 2 e 3 vie e linee parentali (Mühleisen *et al.*, 2014).

Considerati i maggiori costi per l'ottenimento di seme ibrido, e di conseguenza il suo più alto prezzo di mercato, risulta di primaria importanza, per un esito economicamente positivo della coltivazione, l'adozione di basse densità di semina.

Al riguardo, un aspetto positivo di queste costituzioni è rappresentato dall'elevata capacità di accestimento che ne permette semine relativamente rare: circa 150-200 semi/m² anziché 300-350 come previsto in genere per le cultivar omozigoti.

L'impiego di una minore quantità di seme richiede, tuttavia, condizioni del letto di semina e climatiche idonee a garantire un'elevata emergenza oltre all'applicazione di tecniche agronomiche (epoca di semina, dose e modalità di concimazione azotata) atte a favorire una rapida copertura fogliare del terreno (Blandino *et al.*, 2015).

Bibliografia

- Abdel-Ghani A.H., Parzies H.K., Ceccarelli S., Grando S., Geiger H.H. 2005. Estimation of quantitative genetic parameters for outcrossing-related traits in barley. *Crop Science*, 45: 98–105.
- Ahokas H. 1979. Cytoplasmic male sterility in barley. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 29: 219–224.
- Ahokas H. 1982. Cytoplasmic male sterility in barley. XI. The msm2 cytoplasm. *Genetics*, 102: 285–295.
- Australian Government. Department of health and ageing. Office of the gene technology regulator. 2008. The biology of *Hordeum vulgare* L. (barley). [http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/barley-3/\\$FILE/biologybarleyo8.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/barley-3/$FILE/biologybarleyo8.pdf)
- Blandino M., Marinaccio F., Reyneri A. 2015. La tecnica agronomica per gli orzi ibridi. *L'Informatore agrario*, 35: 43–46.
- Campbell K.W., Kasha K.J. 1981. Selection for cross-pollination in barley using segregating bulk populations. *Canadian Journal of Plant Science*, 61: 17–24.
- Conti S., Ferraresi A. 1972. Valutazione dell'eterosi e delle componenti della varianza genetica in ibridi di orzo. *Genetica Agraria*, 26: 128–142.
- Einfeldt C.H.P., Ceccarelli S., Grando S., Gland-Zwenger A., Geiger H.H. 2005. Heterosis and mixing effects in barley under drought stress. *Plant Breeding*, 124: 350–355.
- Foster C.A., Fothergill M. 1982. Breeding F1 hybrid barley. In: *Barley Genetics IV, Proceedings 4th Barley Genetics Symposium*. Edinburgh, UK, pp 766–771.
- Hayes J.D. 1968. The genetic basis of hybrid barley production and its application in western Europe. In: Zeven A.C., ed.: *Cereal improvement. Hybrid varieties and aspects of culm shortening. Proceedings of the joint meeting of the sections cereals and physiology of Eucarpia*. Wageningen 24–26 October 1967 *Euphytica*, Vol. 17, Suppl. 1: 87–102.
- Kempe K., Gils M. 2011. Pollination control technologies for hybrid breeding. *Molecular Breeding*, 27: 417–437.
- Longin C.F.H., Mühleisen J., Maurer H.P., Zhang H., Gowda M., Reif J.C. 2012. Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 1087–1096.
- Mühleisen J., Maurer H.P., Stiewe G., Bury P., Reif J.C. 2013. Hybrid breeding in barley. *Crop Science*, 53: 819–824.
- Mühleisen J., Piepho H.P., Maurer H.P., Longin C.F.H., Reif J.C. 2014. Yield stability of hybrids versus lines in wheat, barley, and triticale. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 309–316.
- Noli E., Conti S. 2016. Aspetti sementieri nella produzione di ibridi di frumento. *Dal Seme*, 1: 22–28.
- Parzies H.K., Schnaithmann F., Geiger H.H. 2005. Pollen viability of *Hordeum* spp genotypes with different flowering characteristics. *Euphytica*, 145: 229–235.
- Ramage R.T. 1965. Balanced tertiary trisomics for use in hybrid seed production. *Crop Science*, 5: 177–178.
- Ramage R.T. 1983. Heterosis and hybrid seed production in barley. In: R. Frankel editor, *Heterosis: Reappraisal of theory and practice. Monograph on Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 6. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 71–93.
- Scholz F., Künzel G. 1982. Progress and problems with hybrid barley. In: *Barley Genetics IV, Proceedings 4th Barley Genetics Symposium*. Edinburgh, UK, pp. 758–765.
- Schooler, A.B. 1967. A form of male sterility in barley hybrids. *The Journal of Heredity*, 58: 207–211.
- Severson D.A., Rasmusson D. C. 1968. Performance of barley hybrids at four seeding rates. *Crop Science*, 8: 339–341.
- Suneson C.A. 1940. A male sterile character in barley. A new tool for the plant breeder. *The Journal of Heredity*, 31: 213–214.
- Wiebe G.A. 1960. A proposal for hybrid barley. *Agronomy Journal*, 52: 181–182.
- Wiebe G.A. 1964. Report from Maryland. *Barley Newletters*, 8: 16.

Marcatori molecolari e protocolli di analisi varietale delle sementi: nuovi sviluppi

L'impiego di marcatori molecolari, affiancato ai tradizionali descrittori morfologici, contribuisce ad una più efficace caratterizzazione delle nuove varietà e offre nuove possibilità per l'analisi delle sementi. L'articolo illustra tre casi nei quali protocolli di analisi molecolare sono stati adottati ufficialmente per l'iscrizione di nuove varietà o per la verifica dell'identità varietale in laboratorio

Lorella Andreani, Chiara Delogu, Rita Zecchinelli

Molecular markers and variety testing: new development

The article presents three cases of implementation of protocols based on molecular markers (microsatellites, SSR) for variety testing in the framework of new varieties registration and of seed quality evaluation. New protocols adopted in Italy for listing soybean varieties and for characterizing new hybrids to be included in the national catalogue of rice varieties are discussed. The inclusion in the ISTA Rules of a molecular method for variety testing in wheat is also presented, as an example of the adoption of DNA based techniques in the daily work of a seed testing laboratory.

Nel corso di questi ultimi anni, la rapida evoluzione delle tecniche molecolari ha permesso per molte specie l'ottenimento di mappe genetiche dettagliate e lo sviluppo di marcatori molecolari, utilizzati sia nel miglioramento genetico che in studi di caratterizzazione genetica.

A partire dagli anni '80, diversi marcatori molecolari sono stati applicati allo studio delle varietà di specie vegetali, partendo dagli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) fino ad arrivare ai microsatelliti SSR (*Simple Sequence Repeats*) e agli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Inoltre, a partire da tempi più recenti, l'innovazione tecnologica legata alle tecniche di sequenziamento ha permesso di sequenziare interi genomi in tempi rapidi, con un impegno di risorse economiche relativamente ridotto e con risultati un tempo insperati.

I programmi di breeding per lo sviluppo di nuove varietà vegetali utilizzano questa grande quantità di nuove conoscenze per meglio comprendere e gestire l'espressione genica di tratti di interesse agronomico. I processi di miglioramento genetico si sono così notevolmente accelerati, garantendo uno sviluppo varietale vivace e continuo, soprattutto per specie importanti dal punto di vista economico, quali mais, cereali, pomodoro.

In questo contesto, in grande evoluzione, non perdono significato né la procedura di iscrizione delle nuove varietà ai Registri Nazionali né l'iter della certificazione delle sementi, che anzi rimangono pilastri fondamentali per garantire le caratteristiche necessarie perché una nuova varietà rappresenti davvero un miglioramento e per rendere disponibili all'agricoltore sementi di elevata qualità, innanzitutto genetica.

Il valore di una semente è infatti strettamente correlato al suo patrimonio genetico e si esprime tramite le caratteristiche morfo-fisiologiche e tecnologiche tipiche di ciascuna varietà.

In base ad una definizione spesso utilizzata, una varietà è la minore delle unità sistematiche del mondo vegetale e può essere definita come un raggruppamento tassonomico in cui le piante che ne fanno parte sono tutte uguali (o molto simili) tra loro e diverse (o comunque distinguibili) da tutte le altre.

In particolare, una varietà per poter essere iscritta nel Registro Nazionale delle varietà e successivamente certificata e commercializzata deve distinguersi nettamente per uno o più caratteri importanti da qualsiasi altra varietà nota; questi caratteri si debbono poter riconoscere e descrivere con precisione. Inoltre, una varietà deve essere uniforme, stabile, cioè mantenere le proprie caratteristiche genetiche nel corso dei diversi cicli riproduttivi e possedere un valore agronomico o di utilizzazione soddisfacente, apportando un miglioramento per la coltivazione, per la gestione dei raccolti o l'impiego dei prodotti ottenuti.

Le analisi varietali: stato dell'arte

Tradizionalmente le varietà vengono descritte e valutate sulla base di caratteri morfofisiologici, a cui si aggiungono alcuni marcatori biochimici come gli isoenzimi per la verifica della formula degli ibridi di mais e girasole e le proteine di riserva del seme per descrivere le varietà di frumento tenero, duro e orzo.

Nel corso degli ultimi anni, UPOV (*International Union for the Protection of New Variety of Plants*) ha riconosciuto la possibilità di utilizzare marcatori di tipo molecolare per la gestione delle collezioni di riferimento, per la rilevazione di caratteri specifici e per la descrizione varietale a complemento dei caratteri morfo-fisiologici (UPOV/INF/17/1⁽¹⁾ del 2010 e UPOV/TGP/15/1⁽²⁾ del 2013). L'impiego dei marcatori molecolari è argomento di grande in-

teresse anche per altre organizzazioni internazionali del settore sementiero (es. ISTA – *International Seed Testing Association*; OCSE – *Organization for Economic Co-operation and Development*).

Diversi sono i marcatori molecolari sviluppati in ambito scientifico, ma solo alcuni presentano le caratteristiche adatte allo sviluppo di un protocollo per la caratterizzazione varietale (UPOV/ INF/17/1).

Tra questi possono essere senz'altro citati i cosiddetti microsatelliti o SSR (*Single Sequence Repeats*). Queste regioni del DNA sono caratterizzate dalla presenza di brevi sequenze nucleotidiche costituite da due o più basi ripetute consecutivamente (es: ATATATATAT; CGTCGTCGTCGT). Gli individui analizzati possono distinguersi tra loro per il diverso numero di ripetizioni che compongono tali sequenze.

Ogni microsatellite può essere interpretato come un locus genico i cui alleli sono costituiti da frammenti di diversa misura proporzionata al numero di ripetizioni nucleotidiche.

Questi marcatori sono distribuiti nell'intero genoma degli eucarioti, sono altamente polimorfici, indipendenti dalle condizioni ambientali e rilevabili attraverso l'applicazione di tecniche consolidate (PCR ed elettroforesi).

Il loro utilizzo per lo studio della variabilità genetica è ampiamente documentato per numerose specie vegetali tra cui anche molte di interesse agricolo.

Grazie alle loro caratteristiche, gli SSR permettono di identificare i diversi alleli ad un singolo locus, di catalogare le accessioni di una specie, di creare un database di dati molecolari affiancabili ai dati morfologici rilevati in campo. I microsatelliti, inoltre, sono marcatori codominanti e, permettendo il riconoscimento degli individui omozigoti ed eterozigoti, consentono anche la valutazione della genealogia degli ibridi rispetto alle loro linee parentali.

Qualsiasi sia lo scopo dell'analisi, per le proprie verifiche il laboratorio deve scegliere numero e tipologia di marcatori SSR; questa scelta deve tener conto di alcuni fattori:

- elevato grado di polimorfismo rilevabile in varietà opportunamente scelte e rappresentative del germoplasma impiegato nel miglioramento genetico per la costituzione delle nuove varietà;
- numero di alleli presenti ad ogni locus SSR;
- buona distribuzione nel genoma, mediamente un marcatore SSR per cromosoma;
- presenza di alleli rilevabili senza ambiguità;
- condizioni di amplificazione comuni (ad es. stessa temperatura di annealing) tali da consentire l'allestimento

di saggi PCR multiplex allo scopo di ottimizzare tempi di lavoro e costi;

- dimensione degli alleli tale da permettere la corsa elettroforetica in contemporanea di più marcatori, anche grazie all'utilizzo di primer con differenti marcature fluorescenti.

Proprio grazie alla disponibilità di marcatori SSR dotati dei requisiti appena citati, la tecnologia può ritenersi matura per l'impiego da parte dei laboratori di analisi delle sementi e numerose sono le iniziative mirate alla messa a punto e alla validazione di protocolli standardizzati.

La strada da compiere parte dalla selezione in bibliografia di un ampio pool di marcatori, prescelti sulla base dei criteri cui si è già accennato, dei materiali su cui sono stati utilizzati e della loro affinità con le varietà di interesse, della qualità scientifica della ricerca. Il pool deve essere testato su campioni puri, di cui sia nota l'identità, rappresentanti quanto più possibile la platea delle varietà sulle quali si intende applicare il protocollo in corso di definizione. A seconda delle specie, questa platea può essere più o meno vasta e anche in questo caso ci si può trovare nella necessità di operare una scelta. È infatti necessario rappresentare quanto più possibile la variabilità genetica, includendo varietà geneticamente distanti fra di loro, ma è anche necessario verificare il potere discriminatorio dei marcatori e, pertanto, dovranno essere saggiate anche varietà simili fra loro, dotate di comune base genetica.

Con la sperimentazione *in-house* vengono così definiti i marcatori migliori da includere nel protocollo e vengono stabilite le condizioni ottimali di analisi, sulla base di evidenze sperimentali che dimostrino l'affidabilità del risultato della prova e la sua ripetibilità.

A seconda delle finalità che ci si prefigge, potrà poi seguire un *comparative test* di validazione del metodo, in particolare necessario quando si debba valutare il parametro della riproducibilità.

In ambito nazionale, in particolare allo scopo di valutare la formula degli ibridi, i marcatori molecolari sono stati inseriti nei "Criteri e procedure tecniche per l'iscrizione al Registro Nazionale di varietà di riso", revisionati di recente (Decreto MiPAAF 25 febbraio 2014).

Interessante anche il caso soia, specie per la quale i nuovi criteri per l'iscrizione delle varietà al Registro Nazionale sono in fase avanzata di definizione ed includeranno - accanto alla tradizionale descrizione morfofisiologica - anche la descrizione del profilo molecolare derivante da un set di marcatori SSR appositamente identificato.

Si registrano novità anche a livello internazionale e in particolare in ambito ISTA.

Un gruppo di lavoro costituito nell'ambito del Comitato Tecnico Varietà ha lavorato nel corso degli ultimi anni sulla caratterizzazione molecolare di diverse specie.

Il primo risultato tangibile è stato raggiunto nel corso dell'ultimo meeting generale dell'associazione (Tallinn, Estonia, giugno 2016), con l'approvazione di un nuovo metodo di analisi varietale in frumento tenero e duro, metodo che impiega marcatori microsatelliti e che, dopo aver superato con successo uno studio di validazione inter-laboratorio, entrerà in vigore con il 1 gennaio 2017.

I tre casi, a cui si è appena accennato, sono descritti nelle pagine che seguono.

RISO: un protocollo di analisi molecolare per le nuove varietà ibride

Nel corso degli ultimi anni si è proceduto all'aggiornamento dei criteri e delle procedure tecniche per l'iscrizione al Registro Nazionale delle varietà di riso e contestualmente sono state inserite alcune disposizioni particolari



Foto 1. Una risaia in provincia di Vercelli (foto Luigi Tamborini)

per l'iscrizione delle varietà ibride, introducendo per questa finalità l'utilizzo di tecniche molecolari.

La caratterizzazione degli ibridi di riso e l'identificazione delle relazioni genetiche con i loro parentali basata sui caratteri morfofisiologici e agronomici è complessa e può essere condotta valutando solo pochi caratteri, spesso influenzati da fattori ambientali. Al fine di superare queste difficoltà, presso il laboratorio CREA-SCS di Tavazzano (LO) è stato pertanto affrontato uno studio per la messa a punto di un protocollo tecnico che consentisse di correlare in modo certo le varietà ibride con i propri parentali.

Per *Oryza* spp. sono disponibili in letteratura numerosi casi di studio e un ampio database pubblico (www.grame-ne.org) a cui si è fatto riferimento per l'individuazione del gruppo di SSR da utilizzare nella procedura di iscrizione al Registro nazionale delle varietà.

Materiali e metodi

Le analisi sono state condotte su 25 varietà di riferimento opportunamente scelte, sufficientemente rappresentative del panorama varietale italiano ed utilizzate come varietà testimoni nelle prove descrittive per la valutazione dei caratteri morfofisiologici (DUS Test).

Nella prova sono stati incluse anche 2 varietà ibride con i relativi parentali e 3 varietà con profili di amplificazione noti.

Per ciascun campione il DNA è stato estratto utilizzando il metodo C-TAB a partire da 10 giovani piante (plantule di 10 giorni), l'amplificazione dei frammenti di interesse è stata realizzata utilizzando primer fluorescenti in un volume di reazione pari a 10 µl contenente PCR buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPS 0,1 mM, Primer F/R 0,1 µM e 0,5U Taq DNA Polymerasi (Invitrogen). Le reazioni di amplificazione sono state realizzate impiegando un termociclatore (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystem) secondo il seguente profilo termico: 94°C per 3 minuti seguiti da 35 cicli (94°C per 45", 56°C per 30", 72°C per 1'e 30"), 72°C per 20'.

I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi capillare per mezzo di un sequenziatore (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystem) e grazie al confronto con i tre profili varietali noti si è valutata la corrispondenza dei prodotti di amplificazione ottenuti.

Per la messa a punto del protocollo sono stati selezionati inizialmente 28 SSR. Grazie ai risultati ottenuti dall'analisi di questo pool di marcatori si è proceduto ad una ulteriore selezione, eliminando i marcatori monomorfici e quelli con profili elettroforetici di difficile rilevazione. In seguito a questa selezione sono stati scelti 12 SSR (uno per cromosoma) in grado di discriminare le 28 varietà (tabella 1).

SSR	Cromosoma	Paia di basi	Repeat
RM24	1	167-181	(GA) ₂₉
RM475	2	182-222	(TATC) ₈
RM338	3	174	(CTT) ₆
RM252	4	166-214	(CT) ₁₉
RM164	5	234-320	(GT) ₁₆ TT(GT) ₄
RM253	6	97-143	(GA) ₂₅
RM336	7	140-200	(CTT) ₁₈
RM44	8	88-126	(GA) ₁₆
RM219	9	180-222	(CT) ₁₇
RM215	9	147-155	(CT) ₁₆
RM202	11	155-183	(CT) ₃₀
RM235	12	86-134	(CT) ₂₄

Tabella 1. Set di microsatelliti inclusi nel protocollo riso

Risultati

Per tutti i campioni estratti sono stati ottenuti frammenti di amplificazione di misura compresa nell'intervallo atteso. In particolare per le varietà note, è stato possibile verificare la corrispondenza tra i profili descritti in banca dati (www.gramene.org) e quelli effettivamente ottenuti.

Questo ha permesso di verificare l'adeguatezza della procedura utilizzata e la conseguente robustezza del metodo.

Dalla amplificazione dei 12 *loci* scelti, sono stati ottenuti 62 alleli differenti con un PIC (*Polymorphic Index Content*) variabile da un valore minimo di 0,2 ad un valore massimo di 0,78. È stato quindi possibile identificare in modo univoco ciascuno dei 34 genotipi inclusi nell'analisi e cioè le 25 varietà italiane, le 3 varietà con profilo noto e i 2 ibridi con i rispettivi parentali. Nel caso specifico degli ibridi, ben 5 dei microsatelliti esaminati (RM24, RM259, RM252, RM241 RM334) hanno mostrato un profilo diverso in almeno uno dei due parentali, rendendo quindi possibile la verifica delle rispettive formule e la differenziazione dei due ibridi (un esempio è rappresentato in foto 2).

Il protocollo è stato pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale n. 91 del 18 aprile 2014 (Decreto del MiPAAF 25.02.2014).

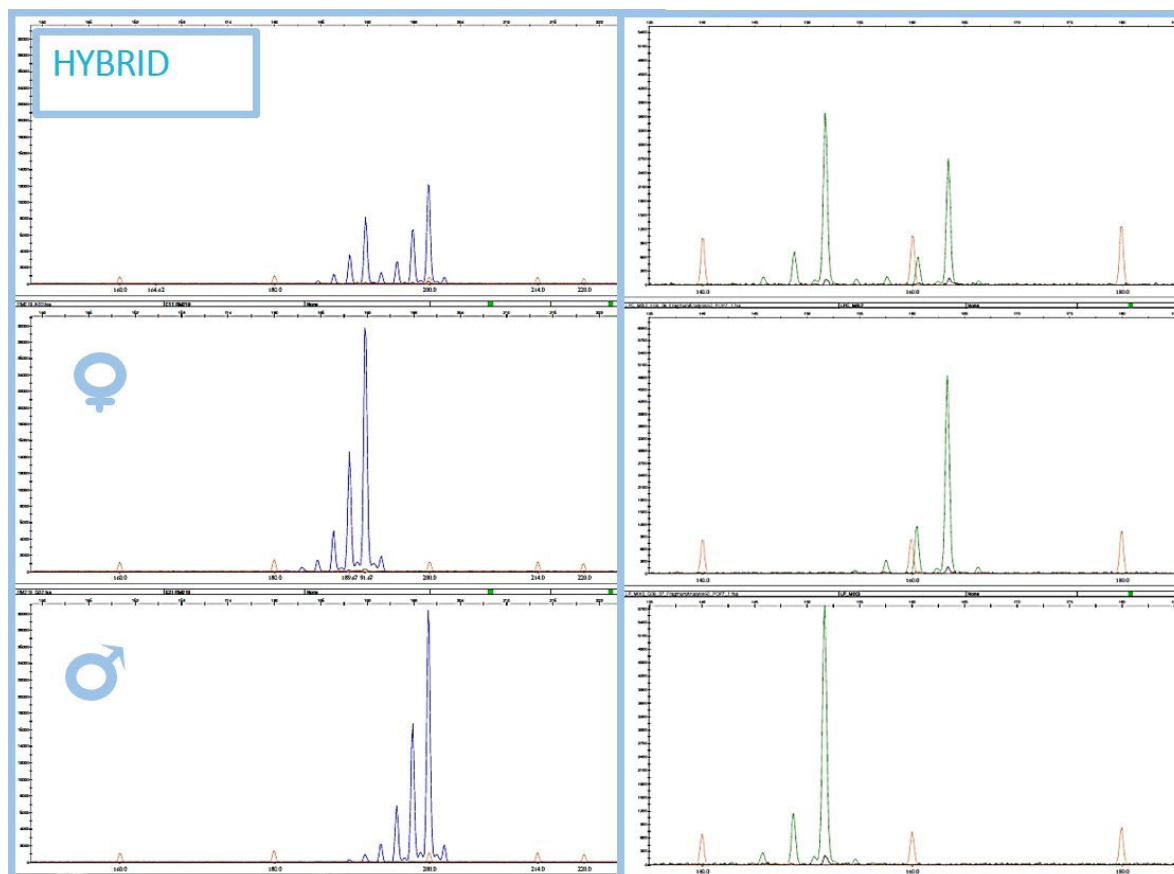


Foto 2. Esempio di profilo molecolare ottenuto da 2 marcatori SSR in riso: le linee parentali presentano profilo omozigote, l'ibrido è eterozigote



Foto 3. Pianta di soia a maturazione (foto CREA-SCS)

SOIA: la superiore efficienza dei marcatori molecolari rispetto ai marcatori biochimici

Il laboratorio SCS di Tavazzano ha collaborato alla definizione dei nuovi criteri per l'iscrizione delle nuove varietà al Registro Nazionale per la specie soia. In questo ambito, il laboratorio ha innanzitutto effettuato una prova preliminare, con la quale si è messa a confronto l'efficienza dei marcatori biochimici (isoenzimi presenti nel protocollo UPOV UPOV/TG/80/6/1998) e dei marcatori molecolari (set di 12 microsatelliti) per la descrizione delle nuove varietà di soia. A questo scopo, sono state esaminate con entrambe le tecniche otto varietà testimoni utilizzate nella prova descrittiva morfofisiologica: Luna, Aires, Nikko, PR91M10, Taira, Atlantic, Ascasubi, Regir. Nella valutazione dei due metodi sono stati presi in considerazione diversi fattori.

- Polimorfismo: la capacità di discriminazione dei marcatori molecolari (SSR) è maggiore rispetto a quella dei marcatori biochimici (isoenzimi); solo grazie ai primi, ogni varietà analizzata ha presentato un profilo genetico unico.
- Esecuzione: il protocollo UPOV/TG/80/6/1998 risulta particolarmente datato, la rilevazione di alcuni profili enzimatici prevede l'impiego di reagenti di non facile

reperibilità e altamente tossici anche per inalazione, fattore questo non trascurabile anche perché le colorazioni enzimatiche vengono fatte in stufa a 37°C; il protocollo molecolare non presenta queste problematiche.

- Costi: il costo medio per campione nel caso dell'impiego dei marcatori biochimici è superiore di circa il 25% rispetto all'impiego dei marcatori molecolari perché è più complesso e comporta l'uso di molti reagenti, di costo elevato.
- Possibilità di automazione: l'analisi con marcatori molecolari può essere automatizzata nelle diverse fasi, dall'estrazione del DNA all'allestimento della PCR, con ulteriore riduzione dei tempi e dei costi.

A seguito di queste considerazioni e per promuovere un rinnovamento tecnico delle prove DUS, l'introduzione delle tecniche molecolari per la caratterizzazione delle nuove varietà di soia è apparsa una scelta opportuna e vantaggiosa.

La sperimentazione presso il laboratorio SCS è proseguita con la finalità di completare i risultati già ottenuti con la prova preliminare.

Per quanto riguarda la soia, sono disponibili in letteratura numerosi casi di studio e un ampio database pubblico (<http://www.soybase.org/tools.php>) a cui si è attinto per l'individuazione di un set più ampio di marcatori.

Sono stati quindi scelti 51 marcatori SSR, testati su 12 varietà, rappresentative del panorama commerciale italiano e opportunamente scelte in base alla classe di precocità e alla loro genealogia. I dati ottenuti sono stati registrati e successivamente rielaborati grazie all'utilizzo di software specifici per la valutazione delle distanze genetiche (Felsenstein, J.; Peakall, R and Smouse P.E.).

Dai risultati ottenuti sono stati selezionati 20 marcatori che hanno mostrato caratteristiche ideali per poter essere utilizzati nella descrizione delle varietà di soia in iscrizione:

- elevato grado di polimorfismo (numero di alleli rilevabili per ogni locus SSR);
- buona distribuzione nel genoma, un marcatore per ciascun cromosoma;
- presenza di alleli rilevabili senza ambiguità;
- condizioni di amplificazione tali da consentire l'allestimento di saggi PCR multiplex allo scopo di ottimizzare tempi di lavoro e costi.

Sulla base di questi risultati è stata proposta la procedura di analisi sintetizzata nel box di seguito. Questa procedura sarà parte dei nuovi criteri per l'iscrizione al Registro

Iscrizione al registro di nuove varietà di soia: procedura di analisi molecolare (breve sintesi della procedura in corso di approvazione)

Scopo e applicazione

Scopo della prova è la descrizione del profilo molecolare delle nuove varietà di soia in corso di iscrizione al Registro Nazionale. Il profilo molecolare si ottiene dalla combinazione di 20 microsatelliti, ben distribuiti nel genoma e caratterizzati da elevato livello di polimorfismo.

L'analisi viene eseguita in entrambi gli anni di prova. Nel caso in cui la varietà venga iscritta eseguendo un unico anno di prova ufficiale, il costitutore dovrà comunicare il protocollo analitico utilizzato e il profilo molecolare ottenuto.

Il profilo molecolare è incluso nella scheda descrittiva delle nuove varietà, a complemento della caratterizzazione morfofisiologica.

Campione di analisi

L'analisi è condotta su 16 individui singoli. In caso di disomogeneità anche per un solo locus SSR vengono analizzati ulteriori 8 individui.

Nel caso di un campione costituito da 24 individui, è ammesso un numero massimo di 2 fuori tipo.

Al secondo anno di prova, l'analisi è ripetuta sul nuovo campione di seme inviato, come necessario per confermare la stabilità genetica del materiale.

Nazionale delle varietà di soia, attualmente in fase di approvazione.

Poiché i protocolli di analisi sono strettamente legati al tipo di attrezzatura di cui si dispone, la procedura lascia ampio grado di libertà sulla modalità di realizzazione delle prove, fermo restando l'obbligo ad utilizzare il set di marcatori prefissato e ad includere nelle prove le varietà testimoni a profilo noto che verranno indicate.

L'impiego congiunto di marcatori di peso molecolare e di varietà a profilo atteso consentirà la valutazione della qualità delle amplificazioni ottenute in ciascuna analisi e la ripetibilità delle misure dei frammenti per ogni marcatore nei due anni di prova.

I profili molecolari consentiranno di completare la descrizione della varietà, in aggiunta ai dati morfofisiologici. I risultati ottenuti in entrambi gli anni di prova saranno conservati in un database del laboratorio CREA-SCS di Tavazzano (LO).

Materiali e metodi

I 20 marcatori microsatelliti e le loro caratteristiche sono elencati in tabella 2; l'impiego dei 20 marcatori è obbligatorio.

Estrazione degli acidi nucleici: suggerito il metodo C-TAB ⁽¹⁾. In alternativa, possono essere utilizzati kit commerciali di estrazione.

Reazione di amplificazione e sistemi di rilevazione: è possibile il ricorso a strumentazioni e protocolli analitici diversi.

Riconoscimento degli alleli codificati dai marcatori SSR: è raccomandato l'impiego di marcatori di peso molecolare adeguati al sistema di elettroforesi adottato e di varietà a profilo noto e atteso.

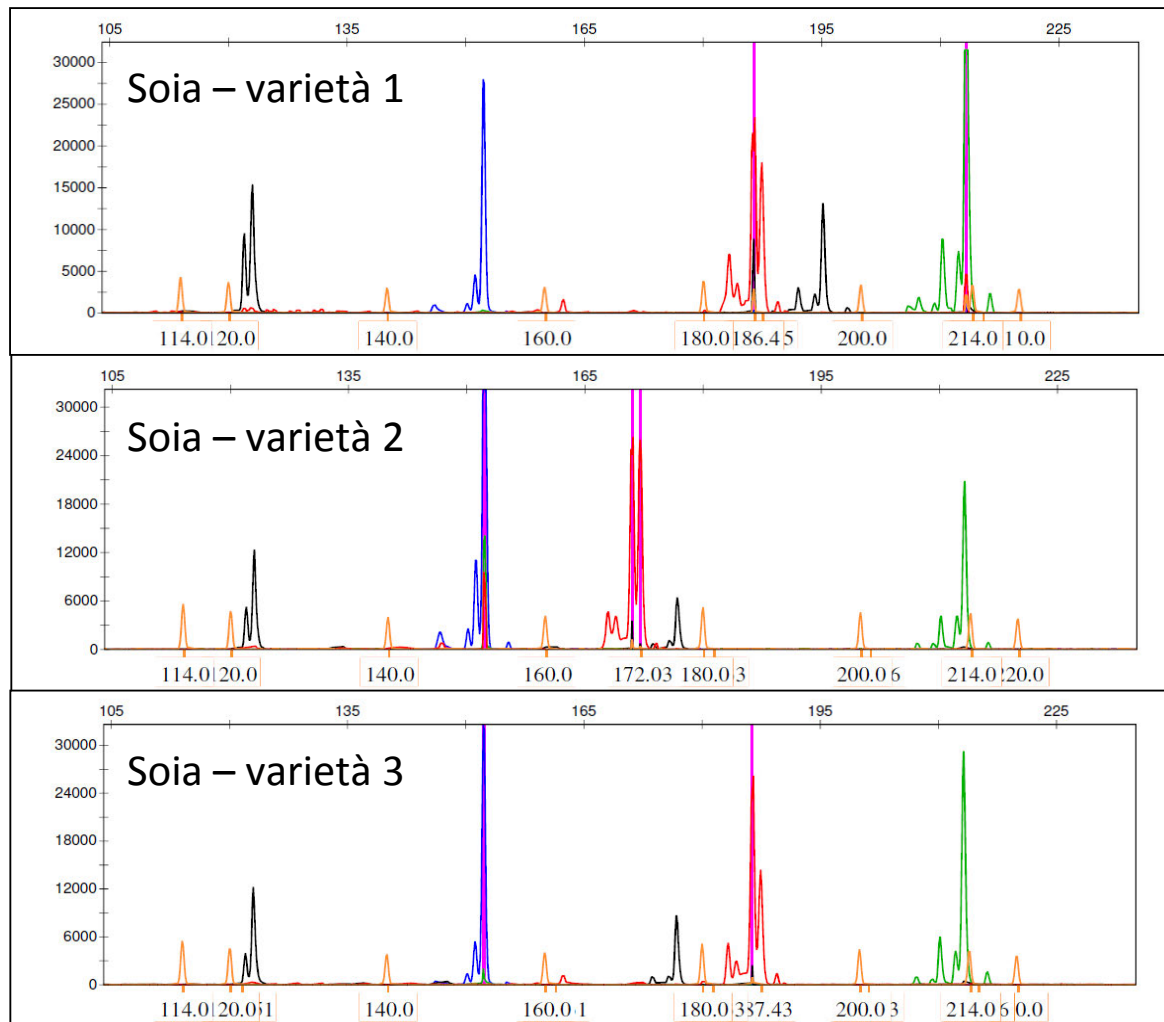
Espressione del risultato

Per ogni marcatore, il risultato dell'amplificazione è espresso in paia di basi. La descrizione del profilo molecolare della varietà è rappresentato dall'insieme delle misure ottenute per l'intero set di marcatori.

Marcatore SSR	Cromosoma	Paia di basi	Repeats
Satt129	01	180-200	(AAT)25
Satt216	02	150-180	(ATT)20
Satt152	03	210-240	(ATA)21
AW277661	04	210-230	(TAT)23
Satt545	05	190-210	(TTA)24
Satt277	06	100-120	(TTA)13
Satt680	07	350-400	(ATT)48
Satt177	08	110-120	3bp
Satt349	09	190-210	(AAT)10
Satt345	10	120-160	(ATT)27
Satt197	11	180-200	(ATT)20
Satt353	12	150-170	(TTA)17
Satt114	13	70-100	(AAT)17
Satt577	14	170-180	(ATT)12
Satt691	15	170-200	(ATT)17
Satt249	16	240-270	(AAT)20
Satt186	17	170-180	(ATT)19
Satt115	18	130-150	(TAT)18
Satt229	19	290-310	(AAT)22
Satt614	20	270-310	(TTA)38

Tabella 2. Set di microsatelliti inclusi nel protocollo soia

Foto 4. Esempio di profilo molecolare di 3 varietà di soia, ottenuto dall'amplificazione di 5 marcatori SSR.



FRUMENTO: ISTA adotta il *Semi Performance Based Approach* (SPBA)

In ambito internazionale, anche ISTA (*International Seed Testing Association*) sta svolgendo un ampio lavoro per la valutazione e l'adozione di metodiche di biologia molecolare per le analisi delle sementi in diverse specie (frumento, soia, mais, riso).

La valutazione della qualità delle sementi è l'ambito specifico di interesse per questa associazione e, in questo contesto, gli aspetti genetici rappresentano una componente molto importante.

Tra le attività più significative svolte da ISTA, va ricordata la pubblicazione delle *International Rules for Seed Testing*, che includono metodi di campionamento e analisi delle sementi. Questi metodi sono il risultato di un processo di validazione che vede partecipare numerosi laboratori, esperti nel particolare settore e localizzati in diversi paesi del mondo.

Per le analisi di tipo tradizionale, le norme ISTA descrivono il metodo di analisi in tutti i suoi dettagli. Nel caso di metodologie di più recente introduzione, si pongono però nuove problemi. Le tecnologie di analisi molecolare, ad esempio, sono in continua evoluzione e si avvalgono



Foto 5. Fuori tipo in una coltura di frumento da seme (foto CREA-SCS)

di strumentazioni diverse, che comportano l'adozione di protocolli specifici. Questo rende impossibile sposare un'unica metodologia, anche in considerazione del fatto che ISTA opera in campo internazionale e si rivolge a numerosi laboratori, ciascuno con la propria dotazione e la propria organizzazione.

Nel caso specifico delle analisi varietali, la procedura di validazione del metodo è stata quindi affrontata con una modalità alternativa, che ha portato all'adozione del cosiddetto *Semi Performance Based Approach* (SPBA).

Con questo approccio "semi-performance", il laboratorio è libero di scegliere alcune componenti del metodo di analisi, sempre che il metodo prescelto sia stato validato internamente per le finalità cui è destinato, dimostrando di rispettare determinati criteri di qualità. In aggiunta a queste componenti, il laboratorio è tenuto ad adottarne altre che invece hanno carattere prescrittivo.

Sulla base della scelta strategica del *Semi Performance Based Approach*, nel corso degli ultimi anni ISTA ha con-

dotto diversi test di comparazione con la finalità di selezionare un numero minimo di marcatori microsatelliti utili per l'identificazione varietale in frumento tenero e duro. Un totale di 7 laboratori di diversi paesi (Canada, Italia, Francia, Austria e Argentina) ha partecipato in uno o più cicli, i marcatori utilizzati sono stati di volta in volta valutati, con sostituzione di quelli risultati non adatti e scelta dei migliori, lo spettro delle varietà testate si è via via allargato.

Globalmente, con questo studio si è analizzato il profilo molecolare di 84 varietà rappresentative del panorama varietale in *Triticum* a livello mondiale e si sono testati 17 marcatori, precedentemente citati in bibliografia.

I risultati ottenuti sono stati valutati statisticamente e l'esito di questa valutazione fa parte di un rapporto molto dettagliato.

L'esito positivo dello studio di validazione ha portato all'approvazione del nuovo metodo di analisi varietale in frumento tenero e duro che sarà pubblicato e entrerà in vigore con il 1 gennaio 2017.

Questo metodo prevederà l'utilizzo obbligatorio di 8 marcatori SSR e la possibilità di ricorrere facoltativamente ad un secondo gruppo di 6 SSR per ottenere una maggior capacità discriminativa.

Ulteriori marcatori di comprovata affidabilità potranno ancora essere inseriti nell'analisi, in relazione alla problematica analitica cui il laboratorio è chiamato a rispondere.

Il nuovo metodo ISTA include anche utili suggerimenti per le fasi di estrazione del DNA, amplificazione, separazione dei frammenti e valutazione dei risultati.

Conclusioni

L'utilizzo di marcatori molecolari quali i microsatelliti è ormai una realtà. In un prossimo futuro assisteremo senz'altro ad ulteriori sviluppi, con l'utilizzo di altri marcatori, quali gli SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) che già sono utilizzati da alcuni laboratori, sino ad arrivare al sequenziamento dell'intero genoma delle varietà oggetto di caratterizzazione.

L'uso di queste tecniche è destinato ad allargarsi rapidamente anche per la valutazione dei requisiti delle varietà e della qualità delle sementi, ma per questi impieghi è necessario concludere con successo studi di validazione e di armonizzazione dei protocolli. Solo con questo presupposto, l'impiego delle nuove metodiche molecolari può superare i confini della ricerca ed entrare a pieno titolo nei laboratori di analisi.

Bibliografia

- UPOV/INF/17/1 (October 21, 2010) - Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (http://www.upov.int/edocs/infdocs/en/upov_inf_17_1.pdf)
- UPOV/TGP/15/1 (October 24, 2013) - Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (http://www.upov.int/edocs/tgpdocs/en/tgp_15.pdf)
- Criteri e procedure tecniche per l'iscrizione al Registro Nazionale di varietà di riso. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali – Decreto 25 febbraio 2014 (<http://scs.entecra.it/prove%20iscrizioni/indice.html>)
- Sundaram et al (2008). Identification of informative SSR markers capable of distinguishing Hybrid rice parental lines and their utilization in seed purity assessment. *Euphytica* 163:215-224.
- Yashitola et al. (2002). Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Sci.* 42: 1369-1373
- Guangjie et al (2008). Molecular characterization of the recombinant inbred line population derived from a japonica-indica rice cross. *Euphytica* 159: 7382
- Rahman et al. (2009). DNA fingerprinting of rice (*Oryza sativa*) cultivars using microsatellites markers. *Austr. Jour. of Crop Sci.* 3(3): 122-128
- Filho et al.(2007). A set of multiplex panels of microsatellites marker for rapid molecular characterization of rice accessions. *BMC Plant Biology* 7:23
- Casarini et al. (2008). First comparative test on DNA-based methods: final report of the Variety Committee Working Group. ISTA Seed Testing International n°135 April 2008.
- Sito Internet Gramene (www.gramene.org)
- Doyle, J. and Doyle, J.L. (1990) Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- UPOV TG/80/6 (Geneva, 1998) - Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability Soya bean (*Glycine max* (L.) Merrill) (<http://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tgo80.pdf>)
- Hwang, T.Y., Sayama, T., Takahashi, M., et al. 2009, High-density integrated linkage map based on SSR markers in soybean, *DNA Res.*, 16, 213–25.
- Choi, I.Y., Hyten, D.L., Matukumalli, L.K., et al. 2007, A soybean transcript map: gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis, *Genetics*, 176, 685–96.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1992, Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, *Genetics*, 132, 1131–9.
- Akkaya, M.S., Shoemaker, R.C., Specht, J.E., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1995, Integration of simple sequence repeat DNA markers into a soybean linkage map, *Crop Sci.*, 35, 1439–45.
- Song, Q.J., Marek, L.F., Shoemaker, R.C., et al. 2004, A new integrated genetic linkage map of the soybean, *Theor. Appl. Genet.*, 109, 122–8.
- Cregan, P.B., Jarvik, T., Bush, A.L., et al. 1999, An integrated genetic linkage map of the soybean genome, *Crop Sci.*, 39, 1464–90.
- Wang, L., Guan, R., Zhangxiong, L., Chang, R. and Qiu, L. 2006, Genetic diversity of Chinese cultivated soybean revealed by SSR markers, *Crop Sci.*, 46, 1032–8.
- SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox – Integrating Genetics and Molecular Biology for Soybean Researchers (<http://www.soybase.org/tools.php>)
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Peakall, R and Smouse P.E. *Mol. Ecol. Notes.* (2006) 6: 288-295.
- International Rules for Seed Testing, ISTA (<https://www.seedtest.org/en/international-rules-content-1-1-1083.html>)
- Eujayl I., Sorrells M.E., Baum M., Wolters P., Powell W. (2002) Isolation of EST-derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 104:399-407.
- Perry, D.J. (2004) Identification of Canadian durum wheat varieties using a single PCR. *Theoretical and Applied Genetics*. 109:55-61.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M-H, Leroy P., Ganal M.W. (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.
- Method Validation Reports on Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2017 Edition, Validation of a new method for microsatellite marker analysis for wheat variety verification, 10:43 (<https://www.seedtest.org/upload/cms/user/OGM16-o6-Method-Validation-Reports-for-Rules-2017.pdf>)

Le nuove vie del miglioramento genetico delle piante agroalimentari: dalle tecnologie di breeding cisgenico a quelle di editing genomico

I progressi compiuti nel sequenziamento dei genomi hanno permesso l'avanzamento delle conoscenze sulla funzione di molti geni chiave, portando allo sviluppo di nuove biotecnologie per il miglioramento genetico delle specie agro-alimentari. Tra queste il breeding cisgenico e l'editing genomico sono le più promettenti e presentano le potenzialità per intensificare l'agricoltura sostenibile e implementare la sicurezza alimentare, in un'epoca caratterizzata da forte aumento demografico e rapidi cambiamenti climatici

Gianni Barcaccia, Margherita Lucchin

The new ways for the genetic improvement of agrifood plants: from cisgenic breeding to genomic editing technologies

Advances in genome sequencing have led to the rapid development of new biotechnologies for the genetic improvement of crop plants. Among the new biotechnological tools, the most promising are cisgenic breeding and genomic editing, which have great potentials for the intensification of sustainable agriculture systems and the implementation of food security, in response to the growing population and the climate change that we are witnessing. Contrary to what happens with transgenesis, the plant genetically modified by these new technologies has the peculiarity of not having exogenous coding DNA and therefore it is not distinguishable from plants improved using traditional plant breeding schemes. Our goal is to explain how these new biotechnologies work, highlighting the potential applications and drawbacks, compared to traditional plant breeding techniques.

Le sfide che attendono l'agricoltura nei prossimi anni sono tante: la crescente quantità di risorse alimentari necessarie per far fronte all'aumento demografico, i repentini cambiamenti climatici che si riflettono nell'innalzamento costante della temperatura terrestre causando problemi come l'aumento della siccità e della salinità dei suoli, la richiesta di prodotti di qualità e tante altre ancora.

È facile prevedere che l'agricoltura avrà un forte impatto sull'ambiente, provocando uno sfruttamento sempre più ampio delle risorse naturali e influendo sul rilascio di ingenti quantità di prodotti di scarto derivanti dalle attività umane. Il miglioramento genetico delle piante di uso agro-alimentare dovrà portare alla costituzione di varietà in grado di rispondere a queste nuove esigenze.

Con l'obiettivo di soddisfare le richieste della popolazione e allo stesso tempo di garantire una produzione efficiente ed ecologicamente sostenibile, negli ultimi anni sono state sviluppate nuove biotecnologie come alternativa alla transgenesi, e tra queste le più promettenti appaiono il breeding basato su intragenesi o cisgenesi e l'editing genomico.

Biotecnologie sostenibili: dalla transgenesi alla intragenesi e cisgenesi

A seguito delle preoccupazioni della pubblica opinione riguardanti la sicurezza delle colture transgeniche, di recente sono state sviluppate nuove tecnologie per il mi-

glioramento genetico, alternative e migliorative rispetto alla transgenesi, quali l'intragenesi e la cisgenesi che garantiscono successi considerevoli soprattutto per quanto riguarda i caratteri monogenici.

A differenza della transgenesi, che si basa sul trasferimento di uno o più geni esogeni provenienti da specie diversa o anche da regno diverso (ricorrendo ad un transgene tipicamente chimerico), la cisgenesi prevede il trasferimento di uno o più cisgeni ovvero geni nativi con le proprie sequenze regolatrici, e nel normale orientamento, tra organismi appartenenti alla stessa specie o anche a specie diverse, ma affini e sessualmente compatibili. Inoltre, la sequenza codificante del gene trasferito contiene i propri introni e la sua espressione è sotto il controllo del proprio promotore e terminatore. Il termine "cisgenesi" è stato coniato nel 2006 da Schouten, Krens e Jacobsen.

Diversamente dalle piante ottenute da breeding convenzionale, una pianta cisgenica contiene esclusivamente il gene o i geni di interesse del donatore e nessun altro elemento genetico indesiderato. L'intragenesi è un caso particolare poiché gli intrageni sono geni chimerici, in cui la sequenza codificante del gene impiegato nel trasferimento, che non include introni ma prevede la sola presenza di esoni, è assemblata con le sequenze regolatrici di altri geni e/o la sequenza codificante è in orientamento opposto a quello originale. Il termine "intragenesi" è stato introdotto da Rommens nel 2007.

Con la cisgenesi si trasferisce il gene esattamente come

è presente nella specie donatrice, mentre con l'intragenesi si assemblano sequenze (regione codificante, promotore e terminatore) provenienti da più geni. Come conseguenza, l'espressione del gene può essere modificata ricorrendo all'uso di regioni di regolazione diverse da quelle native. La differenza rispetto alla transgenesi risiede nell'origine del gene da trasferire: il donatore è un organismo della stessa specie del ricevente o comunque appartiene a una specie diversa ma affine e sessualmente compatibile.

È importante enfatizzare che con la cisgenesi, la sequenza genica che si trasferisce nel genoma ricevente resta invariata, la regione codificante contiene non solo gli esoni ma anche i propri introni e le sequenze regolatrici originali (promotore e terminatore), disposti secondo il loro normale senso di orientamento. Al contrario, nell'intragenesi si utilizzano promotori, terminatori e sequenze codificanti derivanti da differenti donatori anche se appartenenti a pool genici di specie tassonomicamente affini. Infine, contrariamente a quanto avviene nella cisgenesi, nell'intragenesi le sequenze codificanti possono essere utilizzate nello stesso senso di orientamento che hanno nell'organismo donatore (trasferimento genico con finalità di guadagno di funzione) oppure in senso opposto quando la finalità è il silenziamento genico (Figura 1).

La cisgenesi è una tecnologia concettualmente innovativa rispetto alla transgenesi: offre la possibilità di massimizzare la similitudine del risultato ottenibile con il trasferimento genico convenzionale mediato da incrocio. In virtù di questa peculiarità non è considerata potenzialmente rischiosa

per l'ambiente e la salute. Pertanto, la cisgenesi produce un organismo simile a quello che si ottiene con l'incrocio, avendo però il vantaggio di consentire una riduzione dei tempi necessari per giungere alla varietà ed evitando il trasferimento indesiderato di sequenze associate al gene di interesse, spesso aventi un effetto negativo sul fenotipo.

Negli ultimi anni queste tecnologie sono state utilizzate in diverse specie per migliorare caratteri rilevanti in agricoltura, come la resistenza/tolleranza a stress biotici e abiotici, con effetti positivi sulle produzioni, in termini quantitativi e qualitativi.

Per l'ottenimento di piante geneticamente migliorate attraverso cisgenesi e intragenesi sono necessarie le stesse tecniche utilizzate per la produzione di piante transgeniche. Il metodo di trasferimento di DNA più utilizzato

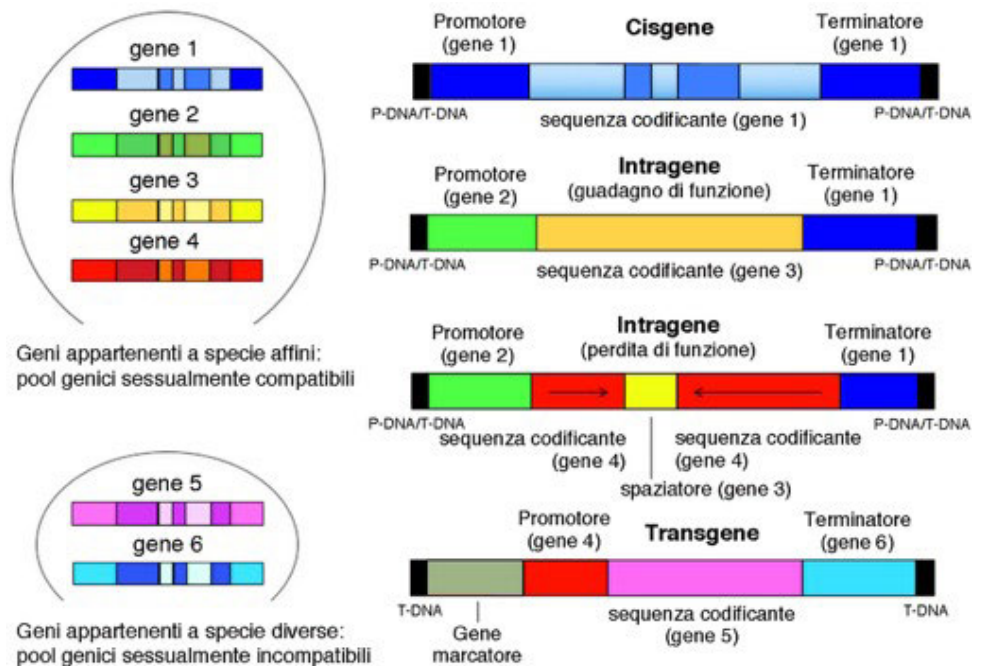


Figura 1: **Cisgenesi:** il cisgene è una copia identica di un gene selezionato da un pool genico sessualmente affine alla specie nell'ambito della quale si vuole migliorare una varietà: esso include gli stessi introni, il promotore e il terminatore nativi. **Intragenesi:** l'introgene è prodotto in vitro attraverso tecniche di ingegneria genetica: il promotore, il terminatore e la sequenza codificante, composta di soli esoni, sono riorganizzati combinando sequenze provenienti da geni diversi selezionati in specie sessualmente compatibili. **Transgenesi:** con la transgenesi si trasferisce un gene chimerico prodotto combinando insieme la regione codificante, composta di soli esoni poiché gli introni vengono solitamente rimossi, e regioni di regolazione proveniente da specie, talvolta regni diversi, ad esempio promotore di origine virale e terminatore di origine batterica.

per le dicotiledoni prevede il ricorso ad *Agrobacterium tumefaciens*, mentre per le monocotiledoni e le specie che presentano una bassa suscettibilità all'infezione da parte di questo agrobatterio, il trasferimento di DNA prevede l'uso di un acceleratore di particelle (*particle gun*). Una differenza fondamentale tra cisgenesi e intragenesi riguarda le sequenze di confine del T-DNA nel vettore plasmidico, sequenze che sono trasferite nella pianta come conseguenza del processo di trasformazione genetica mediato da *Agrobacterium*.

Alcuni autori ritengono che le sequenze di confine del vettore plasmidico, utilizzate per cisgenesi e intragenesi, debbano provenire da genomi di piante, appartenenti a specie affini sessualmente compatibili. Sequenze di confine derivanti da piante, note anche come P-DNA, con proprietà simili al T-DNA, sono state identificate in diverse specie vegetali. Tuttavia, argomentazioni che sostengono l'utilizzo di T-DNA, affermano che queste sequenze di confine derivanti da organismi batterici si possano ugualmente trovare all'interno dei genomi delle piante, poiché sono state acquisite nel corso dell'evoluzione e, siccome per loro natura sono sequenze non codificanti, si possono ritenere sicure da utilizzare.

In termini applicativi, cisgenesi e intragenesi hanno entrambe lo scopo di conferire nuove caratteristiche alla pianta modificata, sia attraverso guadagno di funzione (cambiamento genico) che perdita di funzione (silenzamento genico). Tuttavia, solo la cisgenesi può garantire l'ottenimento di risultati conseguibili anche con metodi convenzionali di miglioramento genetico, ma con tempistiche molto più contenute ed evitando effetti di *linkage drag* che talvolta portano anche all'accumulo di sostanze antinutrizionali nei prodotti alimentari.

Un'altra potenzialità della cisgenesi rispetto al miglioramento genetico tradizionale riguarda la sovra-espressione di un gene. Con la cisgenesi è possibile inserire una oppure più copie aggiuntive del gene di interesse, consentendo l'aumento della manifestazione fenotipica per quel determinato carattere. Anche l'intragenesi offre maggiori possibilità di modifica dell'espressione di un gene rispetto agli schemi tradizionali basati su ibridazione e selezione, poiché prevede combinazioni di regioni di regolazione, quali promotori e terminatori, presi da donatori differenti rispetto alla specie di origine della sequenza codificante. Dal confronto tra cisgenesi e intragenesi si evince che è la prima ad essere più simile al miglioramento genetico tradizionale, mentre la seconda è più affine alla transgenesi.

Da più parti si ritiene che l'inserimento casuale della sequenza di DNA nel genoma della pianta target costituisca una limitazione di queste nuove tecnologie poiché la ricombinazione di un gene in uno specifico tratto cromosomico potrebbe alterare l'espressione di altri geni presenti nel genoma ricevente, determinando così rischi non prevedibili. Bisogna però considerare che anche con l'ibridazione si promuove la ricombinazione casuale di geni e che pertanto l'inserimento casuale di DNA dal donatore al ricevente si verifica anche impiegando metodologie tradizionali di miglioramento genetico, da sempre utilizzate per la costituzione di nuove varietà.

Altri timori suscitati dalle piante geneticamente modificate sono connessi ai potenziali rischi della diffusione di nuove combinazioni geniche nell'ambiente. Le piante geneticamente modificate avendo caratteri nuovi o più marcati rispetto alle piante selvatiche della stessa specie, e quindi esprimendo una *fitness* superiore, potrebbero prendere il sopravvento sulle ultime; si teme quindi un effetto di *gene escape* incontrollabile e una perdita irreversibile di biodiversità (*genetic erosion*).

Nel 2011, la Commissione Europea (CE) ha chiesto all'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (*European Food Safety Authority*, EFSA) di valutare i pericoli connessi a cisgenesi e intragenesi rispetto a transgenesi e breeding tradizionale. Quando si considerano i pericoli legati alle piante cisgeniche e intrageniche, le principali considerazioni da parte del gruppo di esperti di tale autorità riguardano: i) la fonte di derivazione del DNA trasferito; ii) le alterazioni del genoma ospite nel tratto cromosomico in cui avviene l'inserimento di DNA; iii) la potenziale presenza nel genoma delle piante di sequenze di DNA non vegetali; iv) l'espressione del gene contenuto nel DNA trasferito.

Come per il miglioramento genetico tradizionale, anche per cisgenesi e intragenesi si deve fare uso di pool genici primari, secondari e terziari. Tuttavia, quando un gene di interesse è utilizzato per produrre piante intrageniche, si possono creare nuove combinazioni genetiche che non sono possibili in piante cisgeniche e nemmeno in quelle derivanti da breeding tradizionale. Queste nuove combinazioni genetiche possono portare alla manifestazione di caratteri nuovi con pericoli ancora non conosciuti ed è per questo motivo che l'EFSA ha definito i rischi connessi all'intragenesi del tutto simili a quelli associati alla transgenesi. Al contrario, la tecnologia basata sulla cisgenesi si avvicina molto al miglioramento genetico tradizionale e in virtù di questa sua peculiarità non è considerata

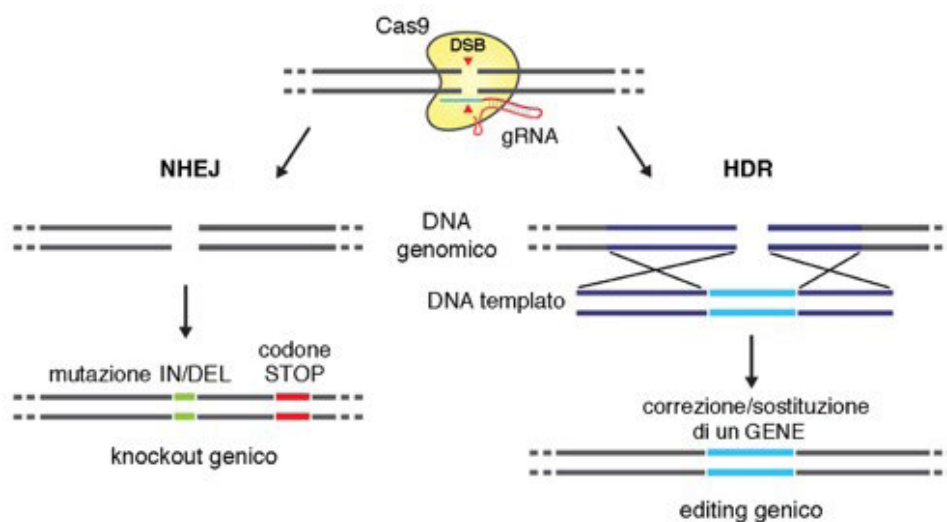


Figura 2: Editing genomico con nucleasi sito-specifiche. I tagli indotti del DNA (DSB) possono essere riparati attraverso due percorsi differenti: *non-homologous end joining* (NHEJ) oppure *homology directed repair* (HDR). Le riparazioni NHEJ solitamente determinano inserzione o delezione di singoli nucleotidi (IN/DEL) con conseguente mutazione di tipo frameshift che determina un codone di stop inatteso, provocando così knockout genico (silenzamento di un gene); con la riparazione HDR, quando è presente il DNA di un donatore, questo viene utilizzato come template per avere un editing genico attraverso l'inserzione di alcuni nucleotidi (correzione della sequenza di un gene) oppure di un intero gene (sostituzione o inserzione di un gene).

dall'EFSa potenzialmente rischiosa per l'ambiente e la salute.

Nuove biotecnologie sostenibili: editing genomico

Il "genome editing" comprende un insieme di tecniche in grado di correggere, rimuovere, inserire o sostituire specifiche sequenze di DNA in un punto preciso del genoma. In altre parole, l'editing genomico consente di produrre mutazioni mirate in siti specifici del genoma avvalendosi di enzimi nucleasi capaci di tagliare la doppia elica del DNA e sfruttando i meccanismi cellulari di riparazione. Si possono così realizzare diverse modifiche del genoma a seconda del percorso di riparazione delle rotture del DNA: la congiunzione delle estremità terminali non omologhe (*non-homologous end joining*, NHEJ) o la riparazione basata sulla ricombinazione omologa (*homology directed repair*, HDR), come illustrato in Figura 2. Il meccanismo NHEJ causa inserzioni o delezioni casuali che possono portare a mutazioni in grado di inibire il funzionamento del gene se avvengono nella sua regione

codificante. Una seconda via di riparazione è quella basata sul meccanismo HDR che richiede l'introduzione simultanea di endonucleasi ingegnerizzate che inducono il taglio sito-specifico nel cromosoma e un donatore di DNA omologo che viene usato come stampo per la inserzione o sostituzione del gene.

Una volta creato il taglio sul doppio filamento di DNA, la cellula ripara il danno utilizzando i meccanismi naturali di riparazione: nel caso di congiunzione non omologa (NHEJ), le due estremità terminali vengono saldate in modo impreciso consentendo di aggiungere/rimuovere alcuni nucleotidi e determinando l'inattivazione mirata del gene (ad esempio, inattivazione di geni di

suscettibilità a patogeni) e la produzione di un fenotipo mutato. Tale risultato è del tutto analogo a quelli derivanti da mutazioni spontanee o indotte. Nonostante questo sia il meccanismo più comune nelle piante, è stato dimostrato che fornendo un frammento di DNA omologo al sito bersaglio tagliato, aumenta la frequenza di riparazione mediante ricombinazione omologa (HR). In questo caso il frammento di DNA esogeno fornito viene utilizzato dalla cellula come stampo per la riparazione e, di conseguenza, la sua informazione genetica viene trasferita nel genoma della cellula. In questo modo è possibile modificare/correggere la sequenza di un gene utilizzando un DNA esogeno con sequenza corretta o è possibile inserire un nuovo gene (transgene o cisgene) in una porzione specifica del genoma ospite.

Negli ultimi due decenni, sono state individuate quattro diversi tipi di endonucleasi, ognuna delle quali possiede una particolare struttura in grado di scindere una specifica sequenza di DNA: le *meganucleasi*, le *zinc finger nucleases* (ZFNs), le *Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases* (TALENs) e infine il sistema CRISPR (*clu-*

stered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas (CRISPR-associated).

Fino a qualche anno fa, gli strumenti principali di modifica del genoma erano le nucleasi ZFN e le TALEN. Entrambe sono endonucleasi ingegnerizzate composte di due elementi principali: un dominio in grado di legarsi al DNA e un dominio nucleasico per l'induzione della rottura del DNA nella posizione desiderata del genoma. Solo di recente il sistema CRISPR/Cas9 è risultato essere il metodo più efficace per l'editing genomico, grazie alla sua semplice struttura e la facile applicabilità ad una vasta gamma di organismi.

Nel 2007 un gruppo di ricercatori dell'Università di Laval (Canada) e di un'azienda danese dimostrarono che alcuni batteri conservano nel proprio cromosoma una sorta di "biblioteca" delle infezioni fagiche trascorse che permetteva loro di riconoscere un DNA estraneo già incontrato. Questa "biblioteca" è stata chiamata CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*: brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari) e rappresenta una sorta di immunizzazione presente nel 50% circa dei batteri. Successive analisi bioinformatiche hanno rivelato che nella sequenza CRISPR sono inoltre presenti geni che codificano per endonucleasi dette Cas (CRISPR associated) in grado di tagliare il DNA in un punto preciso della sequenza.

Nel 2011 ricercatori francesi scoprirono che nel sistema CRISPR II, l'enzima Cas9 riconosce esclusivamente un DNA estraneo e lo taglia in modo specifico quando il batterio ha una copia di questa sequenza nel suo CRISPR. Nello stesso anno presso l'Università svedese di Umeå fu dimostrato che l'enzima Cas9 ha bisogno di un piccolo RNA specifico che lo guida nel riconoscimento della sequenza da tagliare. Tali scoperte hanno quindi aperto la possibilità di programmare *in vitro* il taglio di una molecola di DNA in un punto preciso utilizzando una nucleasi Cas9, una copia del DNA bersaglio sotto forma di un piccolo RNA complementare e un altro RNA specifico dell'enzima. I due piccoli RNA possono in realtà essere riuniti in un solo RNA capace di guidare (gRNA) Cas9 verso qualsiasi sequenza di DNA specificata *in vitro*. Questa sorta di sistema immunitario sviluppato dai batteri ha consentito di sviluppare una tecnica per intervenire sulla sequenza di un genoma e correggere in modo mirato un gene.

La tecnologia dell'editing genomico può accelerare il processo di miglioramento genetico in qualunque spe-

cie di uso agro-alimentare, consentendo l'introduzione di precise modifiche che possono interessare sia poche basi nucleotidiche sia intere sequenze geniche. Va inoltre sottolineato che, a differenza di quanto avviene per le mutazioni indotte da radiazioni o agenti chimici, con le tecniche di editing genomico le mutazioni cosiddette *off-target*, cioè quelle che avvengono in siti diversi da quello bersaglio, sono molto rare e possono essere facilmente individuate.

Il sistema CRISPR/Cas9 si sta rivelando uno strumento potentissimo per la ricerca biotecnologica e, in particolare, e per lo studio dei genomi vegetali, anche se molti avanzamenti devono ancora essere messi a punto per una sua concreta applicazione al miglioramento genetico delle colture. In una prospettiva di breve-medio termine il sistema consentirà di realizzare modificazioni mirate nella pianta ospite senza inserire DNA estraneo.

La cellula infatti eliminerà l'enzima e il suo RNA guida e la pianta non conterrà più DNA esogeno nel suo genoma, come avviene nelle piante transgeniche, ma semplicemente modificazioni limitate e ben conosciute. Questo sistema sarà inoltre in grado di consentire una più precisa caratterizzazione e una più efficiente utilizzazione delle risorse genetiche vegetali e un'accelerazione nello sviluppo di nuove varietà.

Da non trascurare è inoltre la possibilità molto vantaggiosa offerta dal sistema CRISPR/Cas9 di poter intervenire su più caratteri contemporaneamente.

L'editing genomico è già stato applicato con successo su alcune piante modello come *Arabidopsis*, ma anche in alcune specie di interesse agro-alimentare consentendo l'ottenimento di mutazioni utili per migliorarne la qualità dei prodotti o la resistenza ai patogeni.

Oltre ai numerosi aspetti tecnici ancora da approfondire (ad esempio, i metodi per un trasferimento transiente di Cas9 e del suo gRNA), non vanno trascurati i problemi derivanti dalla protezione brevettuale dei geni e delle procedure utilizzabili e gli aspetti normativi che, a livello europeo, sono legati non tanto alle caratteristiche intrinseche del prodotto ottenuto, quanto piuttosto alle tecnologie impiegate per il suo ottenimento.

Una delle principali preoccupazioni che hanno suscitato le piante transgeniche riguarda l'integrazione casuale del DNA esogeno nel genoma, secondo eventi che potrebbero potenzialmente determinare nuove combinazioni geniche indesiderate. Le tecnologie di editing genomico permettono di ovviare a questa problematica poiché con-

sentono di inserire o sostituire in un genoma o rimuovere da un genoma sequenze di DNA in regioni predeterminate, attraverso mutazioni sito-specifiche. Ciononostante, non è ancora chiaro se gli organismi prodotti con queste procedure debbano essere regolati dalle attuali leggi previste per gli OGM.

Gli Stati Uniti hanno deciso di focalizzare la loro attenzione sul prodotto finale e, quindi, nonostante le piante siano ottenute attraverso tecniche di ingegneria genetica, il prodotto finale non contiene DNA esogeno e la mutazione indotta non è distinguibile da una mutazione spontanea. Per questi motivi gli Stati Uniti hanno già approvato l'utilizzo in agricoltura di diverse varietà derivanti da editing genomico. Diversa è, invece, la situazione in Europa, dove la direttiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo "sull'emissione deliberata nell'ambiente di organismi geneticamente modificati", stabilisce che un OGM è un organismo "il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con la riproduzione sessuale e/o la ricombinazione genetica naturale".

Però, anziché focalizzare l'attenzione sul prodotto finale, com'è accaduto negli Stati Uniti, l'Europa pone l'attenzione sulla tecnologia cui si ricorre per crearlo.

Conclusioni

L'innovazione nel miglioramento genetico delle varietà di specie coltivate ad uso alimentare è necessaria per far fronte alle sfide dei cambiamenti globali, come la crescita della popolazione e il cambiamento climatico. Nel corso degli anni, l'agricoltura ha modificato e implementato le sue tecniche agronomiche e genetiche, e di conseguenza la capacità di far fronte alle esigenze di una popolazione in forte crescita. Tuttavia, l'utilizzo della transgenesi come possibile risposta a svariate richieste del mercato, degli agricoltori e dei consumatori, non ha risolto questo problema, poiché in molti Paesi non è mai stata pienamente accettata in quanto ritenuta pericolosa a livello ambientale. Il progresso e lo sviluppo di nuove tecnologie alternative alla transgenesi è stato sorprendentemente rapido, portando alla implementazione di procedure di breeding cisgenico e intragenico, e di editing genomico per la costituzione di varietà aventi uno o pochi caratteri migliorati. Tuttavia non è ancora chiaro se l'uso di varietà ottenute attraverso tali nuove biotecnologie debba essere regolato adottando le normative vigenti per gli OGM oppure no.

Nuove biotecnologie: il quadro giuridico della UE

Il quadro giuridico europeo per l'autorizzazione all'immissione in commercio di alimenti derivanti dagli OGM e per la coltivazione di varietà transgeniche è definito dalla Direttiva UE 2015/412 (che modifica la precedente Direttiva 2001/18/CE) e dal Regolamento CE 1829/2003, un insieme di norme il cui scopo è quello di garantire la salute umana, il benessere animale e la tutela ambientale. Inoltre, la Direttiva 2015/412 lascia la libertà agli Stati Membri di approvare o meno la coltivazione nel proprio territorio nazionale di varietà GM precedentemente approvate.

Le nuove tecnologie di breeding cisgenico e di editing genomico consentono di ridurre i potenziali effetti negativi che potrebbero insorgere con l'utilizzo di transgenesi e breeding tradizionale. Esse consentono, infatti, una modifica genetica pre-determinata e sito-specifica all'interno di un genoma e garantiscono la totale assenza di DNA esogeno nelle piante delle varietà sviluppate attraverso questi sistemi. Tuttavia, la direttiva 2001/18/CE stabilisce che se le tecnologie utilizzate per l'ottenimento di un prodotto sono le stesse utilizzate per produrre un OGM, tali prodotti sono da ritenersi OGM. A seguito di questa affermazione, un gruppo di lavoro istituito nel 2007 dalla Commissione Europea ha valutato le nuove tecnologie di trasformazione e modificazione genetica al fine di stabilire se gli organismi risultanti da breeding cisgenico e editing genomico debbano rientrare nel campo di applicazione della normativa UE sugli OGM. Secondo questo gruppo di lavoro (*New Techniques Working Group*), cisgenesi, intragenesi e editing genomico rientrano nella legislazione riguardante gli OGM. Tuttavia, non v'è alcun dubbio che le piante ottenute attraverso cisgenesi e editing genomico siano uguali o assimilabili alle piante ottenute con procedure di breeding tradizionale e, in assenza di DNA esogeno nel loro genoma, non c'è alcun modo di determinare con certezza quali tecniche siano state impiegate per ottenerle.

Se l'Unione Europea scegliesse di proibire la coltivazione e l'importazione perché classificate come OGM, ci si troverebbe davanti ad altri quesiti ancora più ardui: vietare la coltivazione e fidarsi ciecamente di agricoltori e di esportatori che garantiscono prodotti OGM-free im-

possibili da verificare oppure bloccare le importazioni da Paesi che acconsentono alla coltivazione di varietà ottenute attraverso queste tecnologie?

È evidente che la regolamentazione prevista dall'Unione Europea per queste nuove tecnologie non risulti appropriata. La definizione di OGM è stata prodotta nel 2001, quando queste nuove tecnologie non erano ancora state scoperte o sviluppate. La comunità scientifica richiede pertanto una legislazione più flessibile che si basi sulle caratteristiche intrinseche del prodotto finale e che si concentri sulla sua potenziale pericolosità, piuttosto che sul processo che conduce al suo ottenimento. Anche l'Italia, come altri Stati Membri, è in attesa che Bruxelles faccia chiarezza sulla differenza tra queste tecnologie e la transgenesi, e autorizzi la sperimentazione in campo di piante ottenute attraverso cisgenesi e editing genomico.

In conclusione si può affermare che queste nuove biotecnologie sostenibili sono caratterizzate da un potenziale enorme tanto da rappresentare uno strumento importante, se non determinante per l'agricoltura italiana, potendo potenzialmente contribuire a risolvere le esigenze produttive e le problematiche ambientali esistenti del nostro Paese. Riteniamo che le nuove biotecnologie consentiranno non solo di modificare singoli geni, ma anche di agire su intere vie biosintetiche e reti regolative, permettendoci di migliorare la formazione e/o la composizione di singoli tessuti e organi. Non possiamo però più aspettare, né imitare: è tempo di innovare ricorrendo alle nuove vie del miglioramento genetico. Sappiamo indurre le mutazioni genetiche e usare le trasformazioni genetiche per creare nuovi alleli e trasferire nuovi caratteri e abbiamo una grande tradizione nel miglioramento genetico delle piante agrarie, anche supportato da metodi di selezione genetica assistita da marcatori molecolari. Personalmente auspichiamo che si possa e si riesca ad arrivare un giorno non troppo lontano alla coesistenza di diverse tipologie varietali (biotecnologiche, tradizionali, e locali) e sistemi colturali (tradizionali e biologici) e che sia poi compito degli agricoltori e dei consumatori operare delle scelte strategiche, economiche e consumistiche.

Bibliografia

- Ann Ran F., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, vol. 8, pp. 2281-2308
- Baeksted Holme I., Wendt T., Bach Holm P. (2013) Intragenesis and cisgenesis as alternative to transgenic crop development. *Plant Biotechnology Journal*, vol. 11, pp. 395-407
- Bhargava A., Carmona F. (2012) *Cisgenesis and Intragenesis*. Nova Science Publisher, Inc., pp. 137-151
- Bortesi L., Fischer R. (2015) The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, vol. 33, pp. 41-52
- Cardi T. (2016) Cisgenesis and genome editing: combining concepts and efforts for a smarter use of genetic resources in crop breeding. *Plant Breeding*, vol. 135, pp. 139-147.
- Chikelu M., Guimaraes E.P., Ghosh K. (2012) Re-orienting crop improvement for the changing climatic conditions of the 21st century. *Agriculture and Food Security*, vol. 1, art. 7
- Espinoza C., Schlechter R., Herrera D., Torres E., Serrano A., Medina C., Arce-Johnson P. (2013). Cisgenesis and intragenesis: new tools for improving crops. *Biological Research*, vol. 46, pp. 323-331
- EFSA-European Food Safety Authority (2012) Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *Efsa Journal*, 2012
- Hartung F., Schiemann J. (2014) Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal*, vol. 78, pp. 742-752
- Lamalakshmi Devi E., Chongtham S.K., Praveen Holeyachi, Nagma Kousar, Mamta Singh, Chandana Behera, Telem R. S, N.B Singh, Shabir H. Wani (2013) Cisgenesis and Intragenesis: twin sisters for crop improvement. *Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences*, vol. 1(10), pp. 22-26
- Lusser M., Parisi C., Plan D., Rodríguez-Cerezo E. (2011) European Commission, New plant breeding techniques: State-of-the-art and prospects for commercial development. Joint Research Center, 2011
- Quétier F. (2016) The CRISPR-Cas9 technology: closer to the ultimate toolkit for targeted genome editing. *Plant Science*, vol. 242, pp. 65-76

L'applicazione delle moderne tecnologie genomiche al miglioramento genetico

Dopo l'avvento delle piante GM e della selezione assistita con marcatori molecolari, altre tecnologie basate sulle conoscenze dei genomi stanno dando ulteriore impulso al settore. La disponibilità illimitata di marcatori molecolari a basso costo ha aperto la strada alla selezione genomica, mentre le conoscenze sulla funzione dei geni combinata con i nuovi metodi di genome editing apre la strada alla modifica mirata dei geni. Tutto ciò porterà ad un miglioramento genetico ad alto contenuto genomico noto come "next generation breeding".

Agostino Fricano¹, Raffaella Battaglia¹, Teodoro Cardi², Luigi Cattivelli¹

Modern biotechnologies for advanced plant breeding

The genomic revolution of the past decades has greatly improved our understanding of the crop genomes. Beside the traditional marker assisted selection and GM plant technology, the recent sequencing of crop genomes has led to unlimited molecular marker availability. High throughput marker technologies is supporting the genomic selection process. The genomic knowledge generated during the last years are enabling genome editing (site-specific mutagenesis) to obtain new gene sequences leading to new phenotypes. Overall, genomics is transforming plant breeding into a "next generation breeding".

Nel corso degli ultimi 50 anni, i metodi tradizionali di miglioramento genetico sono stati integrati con nuove tecnologie capaci di migliorarne l'efficienza oppure di generare caratteri utili non presenti nelle linee elite (Figura 1).

A partire dagli anni '60 la mutagenesi è stata estensivamente utilizzata per generare nuova diversità genetica da inserire direttamente nei programmi di breeding. Successivamente, l'utilizzo delle colture *in vitro* ha consentito di indurre nuova diversità (variabilità somaclonale), di superare alcune barriere all'incrocio (fusione di protoplasti) e ha rappresentato la premessa metodologica per la trasformazione genetica.

A partire dagli anni '80, la trasformazione genetica ha reso possibile il trasferimento di geni anche tra organismi distanti tra loro ed oggi circa il 12% della superficie agricola mondiale è coltivata con piante GM, principalmente soia, mais, cotone e colza portanti resistenze ad insetti o ad erbicidi (<http://www.isaaa.org/resources/publications/pocketk/16/default.asp>).

A partire dalla fine degli anni '90 la disponibilità di marcatori molecolari ha consentito di determinare associazioni tra specifici marcatori ed i caratteri più rilevanti e di utilizzare questi marcatori per seguire i caratteri associati nel corso della selezione (MAS, Marker Assisted Selection).

La MAS ha permesso di ottenere risultati eccellenti quando applicata a caratteri semplici o spiegati da pochi loci con grossi effetti, tipicamente i loci che controllano la resistenza alle malattie.

Per le principali specie coltivate esistono numerosi marcatori associati a geni rilevanti, a titolo di esempio si segnala un sito dove sono riportati tutti i marcatori validati per la MAS in frumento (<http://maswheat.ucdavis.edu/>) ed i protocolli per il loro utilizzo.

Nel caso di caratteri complessi spiegati da molti loci quantitativi (QTL) con piccoli effetti e largamente influenzati dall'ambiente, come ad esempio la produzione o la tolleranza alla siccità, la MAS non ha raggiunto i risultati

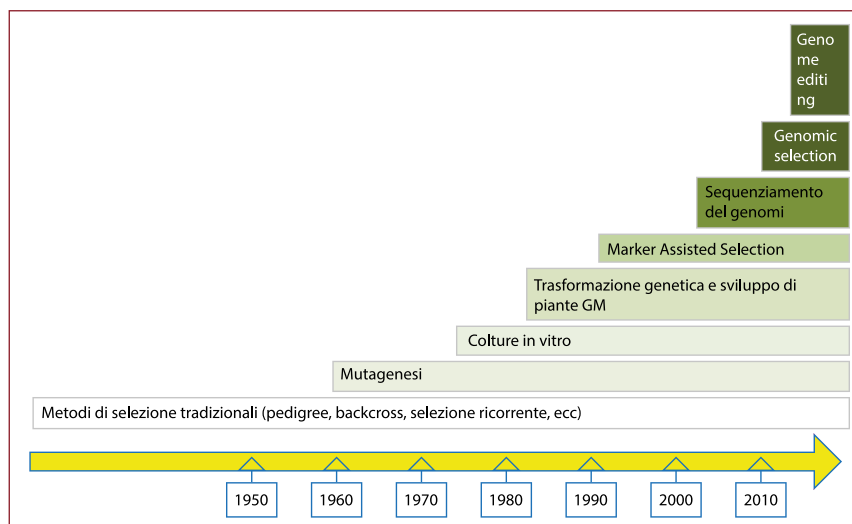


Figura 1. Evoluzione dei metodi e delle biotecnologie per il miglioramento genetico delle piante

¹ Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca per la genomica vegetale, Fiorenzuola d'Arda (PC). — luigi.cattivelli@crea.gov.it

² Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria (CREA), Centro di ricerca per l'orticoltura, Pontecagnano (SA).

desiderati e nuovi approcci sono necessari per affrontare con successo la selezione per questi caratteri.

L'illimitata disponibilità di marcatori molecolari derivante dall'estesa attività di sequenziamento e la loro automazione ha reso possibile l'applicazione della selezione genomica al miglioramento genetico vegetale. L'uso della selezione genomica consentirà di superare i limiti della MAS e di sviluppare una selezione basata sul genotipo.

Le avanzate conoscenze sul genoma delle piante e sulla funzione dei geni hanno aperto la strada a diverse tecniche capaci di modificare in modo predeterminato la sequenza di un gene target (genome editing).

A differenza delle tecniche di mutagenesi naturale e artificiale che si basano sulla probabilità che nel pool di mutazioni indotte ve ne siano alcune in grado di conferire un carattere positivo, il genome editing consente di "centrare il bersaglio" modificando in modo mirato anche una singola base del gene d'interesse per ottenere il fenotipo desiderato.

Dal punto di vista tecnico, il genome editing poggia le basi sulla scoperta di enzimi in grado di tagliare il DNA (nucleasi) e sulla possibilità di creare sequenze che indirizzino in modo preciso le nucleasi verso il loro target. Infine le nucleasi e le sequenze per l'identificazione del target possono essere eliminate lasciando nella pianta solo la mutazione desiderata.

Genomic selection

Mentre la selezione assistita da marcatori molecolari consente di seguire specificatamente alcuni geni di interesse, il successo di una varietà spesso risiede nella combinazione di numerosi QTL ciascuno con un piccolo effetto fenotipico. Per valutare l'effetto complessivo di tutti questi *minor QTL* nel processo di selezione, è possibile utilizzare la selezione genomica (GS, *Genomic Selection*).

La GS calcola il valore genetico degli individui, il quale, a sua volta, stima l'attitudine degli individui a generare progenie con un fenotipo superiore. Marcatori distribuiti sull'intero genoma sono utilizzati per calcolare indici genomici (GEBV, *Genomic Estimated Breeding Value*) che stimano l'effetto dei singoli marcatori e delle diverse combinazioni aploipiche sui caratteri di interesse.

La definizione dei valori di GEBV è realizzata attraverso la comparazione di informazioni genotipiche e fenotipiche in una collezione di germoplasma (definita come *training population*) che rappresenta il pool genico utilizzato

nei programmi di miglioramento genetico.

Successivamente i valori di GEBV sono utilizzati per selezionare popolazioni di piante (*breeding population*) genotipizzate con i marcatori molecolari ma non sottoposte alla valutazione fenotipica (Desta and Ortiz, 2014).

Rispetto alla tradizionale selezione fenotipica, la GS permette di stimare in anticipo il *breeding value* degli individui senza attendere la progenie della generazione successiva riducendo la necessità di estese fenotipizzazioni in campo e, a parità di intensità di selezione, permette di realizzare un uguale o maggiore progresso genetico per unità di tempo ad un costo inferiore (Jonas and de Koning, 2013).

La GS è già utilizzata con successo in diverse specie tra cui frumento, mais, orzo e riso (Tabella 1). La GS può essere utilizzata sia come strumento per ridurre al minimo il numero di piante da fenotipizzare nelle prove di campo, sia in combinazione con la tradizionale selezione fenotipica nell'ambito di schemi di selezione ricorrente.

Nel primo caso i GEBV sono calcolati utilizzando dati genotipici e fenotipici generati a partire da un'ampia collezione di germoplasma (>1000) che possiede una correlazione genetica più o meno elevata con la popolazione da selezionare, anche se l'efficacia della GS è maggiore quanto più il pool genico della popolazione utilizzata per

Specie	Carattere	Referenze
Mais	Produzione, data di fioritura, e <i>anthesis-silking interval</i>	Windhausen et al. 2012
	Produzione, data di fioritura, altezza, in condizioni irrigue e in condizioni di carenza idrica	Zhang et al. 2015
Orzo	Produzione, altezza, resistenza a fusariosi, ed altri caratteri	Sallam et al. 2015
Frumento	Produzione, componenti della produzione, data di fioritura	Lado et al. 2013
	Resistenza alle ruggini	Daetwyler et al. 2014; Rutkoski et al. 2015
Riso	Data di fioritura, altezza, dimensioni del seme	Onogi et al. 2015
	Produzione e componenti della produzione	Xu et al. 2014
	Produzione, data di fioritura, altezza	Spindel et al. 2015
Soia	Peso del seme	Shu et al. 2013
Barbabietola	Contenuto in zucchero, dimensioni delle radici	Würschum et al. 2013

Tabella 1. Esempi di selezione genomica in piante coltivate.



Foto 1: La selezione genomica è stata utilizzata per selezionare linee di frumento dotate di maggior resistenza alle ruggini e linee capaci di produrre farine con migliore attitudine alla panificazione

il calcolo degli GEBV si avvicina a quello della popolazione da selezionare.

L'applicazione della GS ad uno schema di selezione ricorrente invece implica la coincidenza tra *training population* e *breeding population*, una volta stimati i valori di GEBV la popolazione di breeding è sottoposta a cicli di selezione ricorrente nei quali la selezione fenotipica è sostituita dalla GS. La coincidenza tra il gene pool della *training population* e quello della *breeding population* garantisce una elevata accuratezza del processo di miglioramento genetico ed un progresso genetico più elevato di quello ottenibile con i sistemi tradizionali (Bassi *et al.* 2016).

La GS è stata utilizzata con successo per selezionare linee di frumento dotate di maggiore resistenza alla ruggine (*Puccinia graminis*) consentendo di realizzare un progresso genetico simile a quello ottenibile con la tradizionale selezione fenotipica, ma con tempi e costi inferiori. Inoltre i risultati ottenuti hanno evidenziato che a parità di intensità di selezione, la GS permette di ridurre notevolmente la varianza genetica della popolazione selezionata e quindi di ottenere piante con fenotipi più omogenei (Rutkoski *et al.* 2015).

Sempre in frumento, la GS è stata utilizzata in popolazioni doppie aploidi per selezionare in maniera più efficiente linee capaci di produrre farine con una migliore attitudine alla panificazione senza condurre lunghe e costose

valutazioni qualitative (Heffner *et al.* 2011).

Nel mais, la GS è stata applicata ad una popolazione formata dalla progenie di otto incroci bi-parentali per selezionare linee di mais con una maggiore produzione di granella in condizioni di stress idrico. Questi studi hanno dimostrato che gli ibridi creati dalle linee di mais selezionate mediante GS producono il 7.3% in più di granella rispetto agli ibridi sviluppati dalle linee di mais selezionate mediante il classico metodo pedigree (Beyene *et al.*, 2015).

Genome editing

Sin dall'inizio degli anni '80, le tecniche d'ingegneria genetica applicate al miglioramento genetico delle piante hanno rappresentato un notevole passo avanti in termini di precisione, velocità, accessibilità a nuova variabilità genetica e prevedibilità del risultato, rispetto alle procedure convenzionali basate sull'incrocio e la selezione fenotipica, nonostante queste nel tempo siano state integrate con varie (bio)tecnologie cellulari e molecolari.

Per ovviare ad alcune limitazioni della transgenesi tradizionale, però, pochi anni dopo è cominciata un'intensa attività di ricerca finalizzata a trasferire o modificare, in maniera mirata, sequenze geniche specifiche in un genoma target (Cardi and Stewart 2016).

Le tecniche sviluppate per il genome editing e basate sull'uso di oligonucleotidi (ODM, *Oligonucleotide-directed mutagenesis*) e/o di nucleasi sito specifiche (ZFN, Zinc



Foto 2: Nel riso, utilizzando le diverse tecniche di genome editing, sono state ottenute la resistenza a erbicidi e al patogeno *Xanthomonas oryzae*

finger nucleases; TALEN, *Transcriptional activator-like effector nucleases*; CRISPR/Cas9, *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems*) sono le più promettenti e interessanti.

La tecnologia CRISPR/Cas ha sicuramente rivoluzionato lo scenario degli ultimi anni a causa della semplicità

d'uso e l'efficienza dimostrata in diverse specie e per diverse applicazioni.

In Tabella 2 sono riportate alcune applicazioni delle tecnologie sopra citate in specie e per obiettivi d'interesse agrario.

In riso, la resistenza a erbicidi è stata ottenuta intro-

Specie	Carattere	Gene	Modificazione sito-specifica	Tecnologia ^a	Referenze
Riso	Resistenza erbicidi	ALS	Sostituzione base (<i>gene editing</i>)	ODM	Okuzaki and Toriyama 2004
	Resistenza a maculatura batterica (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>)	OsSWEET13, OsSWEET14	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN, CRISPR/Cas9	Li et al. 2012; Zhou et al. 2015a
	Resistenza erbicidi	OsEPSPS	Sostituzione base (<i>gene editing</i>)	TALEN	Wang et al. 2015
	Conservabilità semi	Lox3	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Ma et al. 2015
	Fragranza	OsBADH2	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Shan et al. 2015
Grano tenero	Resistenza a oidio (<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	TaMLO-A1, TaMLO-B1, TaMLO-D1	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN, CRISPR/Cas9	Wang et al. 2014
Mais	Resistenza erbicidi	ALS	Sostituzione base (<i>gene editing</i>)	ODM	Zhu et al. 2000; Zhu et al. 1999
	Maschiosterilità	Ms26	Indels (<i>gene knockout</i>)	Meganucleasi (I-CreI)	Djukanovic et al. 2013
	Contenuto di acido fitico / Tolleranza a erbicidi	IPK1 / PAT	Indels (<i>gene knockout</i>); Sostituzione gene	ZFN	Shukla et al. 2009
	Contenuto di acido fitico	ZmIPK1A, ZmIPK, ZmMRP4	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN, CRISPR/Cas9	Liang et al. 2014
	Contenuto cere cuticola	glossy2 (<i>gl2</i>)	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Char et al. 2015
	Maschiosterilità; Resistenza erbicidi	Ms26, Ms45; ALS1, ALS2, PAT	Indels (<i>gene knockout</i>), Sostituzione base (<i>gene editing</i>); Aggiunta gene	CRISPR/Cas9	Svitashev et al. 2015
Orzo	Contenuto di acido fitico	HvPAPHy_a	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Wendt et al. 2013
Patata	Contenuto glicoalcaloidi	StSSR2	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Sawai et al. 2014
	Accumulo di zuccheri riduttori a basse temperature; contenuto di acrilamide in seguito a frittura	Vlnv	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Clasen et al. 2016
	Resistenza erbicidi	ALS	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Butler et al. 2015
Pomodoro	Biosintesi antociani	ANT1	Inserzione promotore	TALEN, CRISPR/Cas9	Cermak et al. 2015
	Maturazione frutto	RIN	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Ito et al. 2015
Cetriolo	Resistenza virus	eIF4E	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Chandrasekaran et al. 2016
Broccoli	Sviluppo pianta	BoLC.GA4.b	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Lawrenson et al. 2015
Colza	Resistenza erbicidi	ALS	Sostituzione base (<i>gene editing</i>)	ODM	Gocal et al. 2015
Soia	Composizione degli acidi grassi nei semi	FAD2-1A, FAD2-1B	Indels (<i>gene knockout</i>)	TALEN	Haun et al. 2014
	Resistenza erbicidi	ALS1	Sostituzione base (<i>gene editing</i>)	CRISPR/Cas9	Li et al. 2015
Pompelmo	Resistenza al cancro degli agrumi (<i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i>)	CsLOB1	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Jia et al. 2016
Pioppo	Contenuto lignina; Contenuto tannini condensati	4CL1; 4CL2	Indels (<i>gene knockout</i>)	CRISPR/Cas9	Zhou et al. 2015b

^a ODM, Oligonucleotide-directed mutagenesis; ZFN, Zinc finger nucleases; TALEN, Transcriptional activator-like effector nucleases; CRISPR/Cas9, Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems.

Tabella 2. Esempi di modificazioni indotte con diversi approcci di genome editing in specie e per caratteri d'interesse agrario.

ducendo mutazioni specifiche in geni preselezionati mediante l'uso di oligonucleotidi da soli o combinati con la tecnologia TALEN (Okuzaki and Toriyama 2004; Wang *et al.* 2015). Nella stessa specie, la resistenza a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* è stata perseguita inibendo con TALEN o CRISPR/Cas l'espressione di due geni coinvolti nell'interazione con il patogeno (Li *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2015a).

Per il miglioramento della qualità, la tecnologia TALEN è stata applicata per silenziare i geni *Lox3* e *BADH2*, coinvolti, rispettivamente, nell'ossidazione degli acidi grassi e nella sintesi di acido γ -amminobutirrico. Le piante silenziate mostravano un minor accumulo di composti coinvolti nell'irrancidimento dei semi durante la conservazione o una maggiore sintesi di composti responsabili della fragranza (Ma *et al.* 2015; Shan *et al.* 2015).

In grano tenero è stata riportata una delle applicazioni più interessanti delle tecnologie di genome editing. Infatti, mentre in orzo sono note mutazioni al gene *Mlo* capaci di determinare una resistenza recessiva verso tutte le razze note di oidio (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in frumento mutanti simili non sono mai stati identificati a causa della natura poliploide del suo genoma, tuttavia genotipi resistenti sono stati ottenuti silenziando tutti gli omeoalleli nel locus *Mlo* (Wang *et al.* 2014).

In mais, piante tolleranti a erbicidi sono state ottenute in diversi studi utilizzando le tecnologie ODM, ZFN o CRISPR/Cas, per indurre mutazioni specifiche nel gene endogeno dell'aceto lattato sintasi (*ALS*) oppure per introdurre una copia di un transgene (*pat*) (Shukla *et al.* 2009; Svitashv *et al.* 2015; Zhu *et al.* 2000; Zhu *et al.* 1999).

Una Meganucleasi (I-CreI) o CRISPR/Cas è stata utilizzata per indurre maschiosterilità genica grazie al knockout di diversi alleli coinvolti in questo carattere (Djukanovic *et al.* 2013; Svitashv *et al.* 2015). Il contenuto di cere della cuticola fogliare è stato modificato mediante TALEN disegnate per il locus *Glossy2* (Char, *et al.* 2015), mentre il contenuto di acido fitico nei semi è stato ridotto sia con approcci di gene knockout sia di *gene replacement* basati sull'uso di ZFN, TALEN o CRISPR/Cas (Liang *et al.* 2014; Shukla *et al.* 2009). La tecnologia TALEN è stata utilizzata anche in orzo per ridurre il contenuto di fitati (Wendt *et al.* 2013).

In patata, TALEN appositamente disegnate sono state utilizzate per silenziare i geni *StSSR2* e *Vlnv*, coinvolti, rispettivamente, nell'accumulo di glicocalcoidi e di zuccheri riduttori durante la conservazione a basse tempera-

ture (Clasen *et al.* 2016; Sawai *et al.* 2014).

I tuberi di patata modificati nel gene *Vlnv* accumulavano anche meno acrilamide in seguito a frittura. Inoltre, la resistenza a erbicidi è stata ottenuta inducendo, mediante CRISPR/Cas, piccole inserzioni e delezioni nel gene *ALS* (Butler *et al.* 2015).

Tra le ortive, il miglioramento della qualità nel pomodoro è stato perseguito con approcci TALEN o CRISPR/Cas per inserire un promotore costitutivo davanti alla regione codificante di *ANT1*, un fattore di trascrizione coinvolto nella biosintesi di antociani, oppure per silenziare *RIN*, un altro fattore di trascrizione coinvolto nella maturazione del frutto (Cermak *et al.* 2015; Ito *et al.* 2015).

Piante di cetriolo omozigoti resistenti a diversi virus sono state ottenute inibendo, mediante CRISPR/Cas, entrambi gli alleli del gene *eIF4E*, codificante per un fattore di inizio della traduzione (Chandrasekaran *et al.* 2016). Infine, CRISPR/Cas è stato anche utilizzato per modificazioni strutturali nella sequenza del gene *BolC.GA4.b*, coinvolto nella biosintesi di gibberelline, riducendo lo sviluppo di piante di broccoli (Lawrenson *et al.* 2015).

Tra le colture d'interesse industriale, piante di colza resistenti a erbicidi sono state ottenute utilizzando la tecnologia ODM per indurre le mutazioni desiderate nel gene *ALS* (Gocal *et al.* 2015).

In soia, il contenuto di acidi grassi nei semi è stato modificato applicando TALEN disegnate per due geni codificanti desaturasi (*FAD2-1A*, *FAD2-1B*) (Haun *et al.* 2014), mentre, similmente ad altre specie, una mutazione specifica è stata introdotta nel gene *ALS1* utilizzando CRISPR/Cas (Li *et al.* 2015).

Tra le specie arboree, risultati interessanti sono stati riportati in pompelmo e pioppo. Mediante CRISPR/Cas, piccole mutazioni strutturali sono state indotte nel gene *CsLOB1*, coinvolto nella resistenza all'agente del cancro batterico degli agrumi (*Xanthomonas citri* ssp. *citri*) (Jia *et al.* 2016), e nei geni *4CL1* e *4CL2*, coinvolti nell'accumulo di lignina e tannini condensati in pioppo (Zhou *et al.* 2015b).

Prospettive

I moderni programmi di miglioramento genetico si basano sull'integrazione tra i tradizionali metodi di selezione fenotipica (pedigree, backcross, selezione ricorrente, ecc) e le conoscenze molecolari (MAS, GS, piante geneticamente trasformate o editate).

Le conoscenze dei genomi derivanti dai progetti di sequenziamento, l'illimitata disponibilità di marcatori molecolari e la loro automazione sta rapidamente trasformando il miglioramento genetico verso un processo con un forte contributo genomico e bioinformatico che da più parti viene definito come *next generation breeding* (Barabaschi *et al.* 2016).

Le nuove conoscenze genomiche consentono inoltre di esplorare la diversità genetica tramite approcci di ri-sequenziamento, cioè il sequenziamento dei genomi di numerose accessioni della stessa specie, condotti in parallelo alla tradizionale caratterizzazione fenotipica.

L'implementazione di queste conoscenze porterà a breve ad un ribaltamento del modo tradizionale di analizzare ed utilizzare la biodiversità disponibile. I dati di ri-sequenziamento consentiranno un'analisi *in silico* della diversità allelica per ciascun gene noto (*allele mining*) con l'identificazione di nuove forme alleliche prima della loro verifica a livello fenotipico.

Tuttavia, l'accurata determinazione dei caratteri fenotipici (fenotipizzazione) è oggi, e rimarrà anche in futuro, una capacità fondamentale per la corretta associazione tra marcatori molecolari e tratti fenotipici e lo sviluppo di moderne piattaforme per la fenotipizzazione delle piante rappresenta uno degli investimenti strategici per il futuro del miglioramento genetico.

Con l'introduzione delle nuove tecnologie genomiche il miglioramento genetico si trova alla vigilia di una rivoluzione che permetterà un importante salto qualitativo all'intero settore. Tuttavia, per sfruttare appieno le possibilità offerte dalla genomica servono investimenti in strumentazione ma soprattutto in risorse umane.

Nei prossimi anni, il miglioramento genetico vegetale richiederà una nuova generazione di *breeder* capaci di andare in campo a selezionare visivamente le piante, di leggere le sequenze del genoma per identificare i marcatori e di usare le risorse bioinformatiche per gestire la selezione genomica. Inoltre il miglioramento vegetale trarrà vantaggio dalle conoscenze di genomica funzionale che si tradurranno in piante geneticamente editate (o trasformate) caratterizzate da nuovi caratteri non disponibili nel *gene pool* della specie coltivata.

Come testimoniato dai risultati illustrati in precedenza, il genome editing ha in sé una grande potenzialità, ma lo sfruttamento di questa tecnologia richiede un forte investimento nel settore della genomica funzionale a partire dagli studi sulle specie modello per giungere agli studi più

applicativi sulle piante agrarie. Il genome editing richiede una grande conoscenza dei geni e delle loro funzioni ed in assenza di specifici investimenti in questo ambito sarà difficile riuscire a cogliere le opportunità che queste tecnologie offrono per sviluppare un'agricoltura sempre più sostenibile.

Bibliografia

- Barabaschi D, Tondelli A, Desiderio F, Volante A, Vaccino P, Valè G, Cattivelli L (2016) Next generation breeding. *Plant Sci* 2015;242:3-13 doi:10.1016/j.plantsci.2015.07.010.
- Bassi FM, Bentley AR, Charmet G, Ortiz R, Crossa J (2016) Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Sci* 242:23-36. doi:10.1016/j.plantsci.2015.08.021.
- Beyene Y, Semagn K, Mugo S, Tarekegne A, Babu R, Meisel B, Sehabiague P, Makumbi D, Magorokosho C, Oikeh S, Gakunga J, Vargas M, Olsen M, Prasanna BM, Bänziger M, Crossa J (2015) Genetic gains in grain yield through genomicselection in eight bi-parental maize populations under drought stress. *CropSci.* 55 (2015) 154-163.
- Butler NM, Atkins PA, Voytas DF, Douches DS (2015) Generation and inheritance of targeted mutations in potato (*Solanum tuberosum* L.) using the CRISPR/Cas system. *PLoS One* 10:e0144591
- Cardi T, Stewart CN, Jr. (2016) Progress of targeted genome modification approaches in higher plants. *Plant Cell Rep* 35:1401-1416
- Cermak T, Baltes NJ, Cegan R, Zhang Y, Voytas DF (2015) High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* 16:232
- Chandrasekaran J, Brumin M, Wolf D, Leibman D, Klap C, Pearlsman M, Sherman A, Arazi T, Gal-On A (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol Plant Pathol* doi: 10.1111/mpp.12375.
- Char SN, Unger-Wallace E, Frame B, Briggs SA, Main M, Spalding MH, Vollbrecht E, Wang K, Yang B (2015) Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize. *Plant Biotechnol J* 13:1002-1010
- Clasen BM, Stoddard TJ, Luo S, Demorest ZL, Li J,

- Cedrone F, Tibebe R, Davison S, Ray EE, Daulhac A, Coffman A, Yabandith A, Retterath A, Haun W, Baltes NJ, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2016) Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 14:169-176
- Daetwyler HD, Bansal UK, Bariana HS, Hayden MJ, Hayes BJ (2014) Genomic prediction for rust resistance in diverse wheat landraces. *Theor Appl Genet* 127:1795-803 doi: 10.1007/s00122-014-2341-8
 - Desta ZA and Ortiz R (2014) Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends in plant science* 19:9:592-601
 - Djukanovic V, Smith J, Lowe K, Yang M, Gao H, Jones S, Nicholson MG, West A, Lape J, Bidney D, Carl Falco S, Jantz D, Alexander Lyznik L (2013) Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (MS26) using a re-designed I-CreI homing endonuclease. *Plant J* 76:888-899
 - Gocal GFW, Schöpke C, Beetham PR (2015) Oligo-mediated targeted gene editing. In: Zhang F, Puchta H, Thomson JG (eds) *Advances in New Technology for Targeted Modification of Plant Genomes*. Springer-Verlag New York, pp 73-89
 - Haun W, Coffman A, Clasen BM, Demorest ZL, Lowy A, Ray E, Retterath A, Stoddard T, Juillerat A, Cedrone F, Mathis L, Voytas DF, Zhang F (2014) Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family. *Plant Biotechnol J* 12:934-940
 - Heffner EL, Jannink JL, Iwata H, Souza E and Sorrells M (2011) Genomic selection accuracy for grain quality traits in biparental wheat populations. *Crop Sci* 51:2597-2606
 - Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S (2015) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochem Biophys Res Commun* 467:76-82
 - Jia H, Orbovic V, Jones JB, Wang N (2016) Modification of the PthA4 effector binding elements in Type I CsLOB1 promoter using Cas9/sgRNA to produce transgenic Duncan grapefruit alleviating XccDeltapthA4:dCsLOB1.3 infection. *Plant Biotechnol J* 14:1291-1301
 - Jonas E and de Koning DJ (2013) Does genomic selection have a future in plant breeding? *Trends in Biotechnology* 31:9:497-594
 - Lado B, Matus I, Rodríguez A, Inostroza L, Poland J, Belzile F, del Pozo A, Quincke M, Castro M, von Zitzewitz J (2013) Increased genomic prediction accuracy in wheat breeding through spatial adjustment of field trial data. *G3* 3:2105-2114. doi: 10.1534/g3.113.007807
 - Lawrenson T, Shorinola O, Stacey N, Li C, Ostergaard L, Patron N, Uauy C, Harwood W (2015) Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biol* 16:258
 - Li T, Liu B, Spalding MH, Weeks DP, Yang B (2012) High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat Biotechnol* 30:390-392
 - Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169:960-970
 - Liang Z, Zhang K, Chen K, Gao C (2014) Targeted mutagenesis in Zea mays using TALENs and the CRISPR/Cas system. *J Genet Genomics* 41:63-68
 - Ma L, Zhu F, Li Z, Zhang J, Li X, Dong J, Wang T (2015) TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. *PLoS One* 10:e0143877
 - Okuzaki A, Toriyama K (2004) Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep* 22:509-512
 - Onogi A, Ideta O, Inoshita Y, Ebana K, Yoshioka T, Yamasaki M, Iwata H (2015) Exploring the areas of applicability of whole-genome prediction methods for Asian rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 128:41-53
 - Rutkoski J, Singh RP, Huerta-Espino J, Bhavani S, Poland J, Jannink JL, Sorrells ME (2015) Efficient use of historical data for genomic selection: A case study of stem rust resistance in wheat. *Plant Genome* 8:1-10
 - SallamAH, Endelman JB, Jannink JL, Smith KP (2015) Assessing genomic selection prediction accuracy in a dynamic barley breeding population. *Plant Genome* 8:1-15 doi: 10.3835/plantgenome2014.05.0020
 - Sawai S, Ohyama K, Yasumoto S, Seki H, Sakuma T, Yamamoto T, Takebayashi Y, Kojima M, Sakakibara H, Aoki T, Muranaka T, Saito K, Umemoto N (2014) Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *Plant Cell* 26:3763-3774
 - Shan Q, Zhang Y, Chen K, Zhang K, Gao C (2015)

- Creation of fragrant rice by targeted knockout of the OsBADH2 gene using TALEN technology. *Plant Biotechnol J* 13:791-800
- Shu YS, Yu DS, Wang D, Bai X, Zhu YM, Guo CH (2013) Genomic selection of seed weight based on low-density SCAR markers in soybean. *Genet Mol Res* 12:2178-2188 doi: 10.4238/2013
 - Shukla VK, Doyon Y, Miller JC, DeKolver RC, Moehle EA, Worden SE, Mitchell JC, Arnold NL, Gopalan S, Meng X, Choi VM, Rock JM, Wu YY, Katibah GE, Zhifang G, McCaskill D, Simpson MA, Blakeslee B, Greenwalt SA, Butler HJ, Hinkley SJ, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD (2009) Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 459:437-441
 - Spindel J, Begum H, Akdemir D, Virk P, Collard B, Redoña E, Atlin G, Jannink JL, McCouch SR (2015) Genomic selection and association mapping in rice (*Oryza sativa*): effect of trait genetic architecture, training population composition, marker number and statistical model on accuracy of rice genomic selection in elite, tropical rice breeding lines. *PLoS Genet* 11:e1004982 doi: 10.1371/journal.pgen.1004982
 - Svitashvili S, Young JK, Schwartz C, Gao H, Falco SC, Cigan AM (2015) Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiol* 169:931-945
 - Wang M, Liu Y, Zhang C, Liu J, Liu X, Wang L, Wang W, Chen H, Wei C, Ye X, Li X, Tu J (2015) Gene editing by co-transformation of TALEN and chimeric RNA/DNA oligonucleotides on the rice OsEPSPS gene and the inheritance of mutations. *PLoS One* 10:e0122755
 - Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu JL (2014) Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32:947-951
 - Wendt T, Holm PB, Starker CG, Christian M, Voytas DF, Brinch-Pedersen H, Holme IB (2013) TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barley transformants. *Plant Mol Biol* 83:279-285
 - Windhausen VS, Atlin CN, Hickey JM, Crossa J, Jannink JL, Sorrells ME, Raman B, Cairns JE, Tarekne A, Semagn K, Beyene Y, Grudloyma P, Technow F, Riedelsheimer C, Melchinger AE (2012) Effectiveness of genomic predictions of maize hybrid performance in different breeding populations and environments. *G3* 2:1427-1436 doi: 10.1534/g3.112.003699
 - Würschum T, Reif JC, Kraft T, Janssen G, Zhao Y (2013) Genomic selection in sugar beet breeding populations. *BMC Genetics* 14:85 doi: 10.1186/1471-2156-14-85
 - Xu S, Zhu D, Zhang Q (2014) Predicting hybrid performance in rice using genomic best linear unbiased prediction. *Proc Natl Acad Sci USA* 111:12456-12461 doi: 10.1073/pnas.1413750111
 - Zhang X, Pérez-Rodríguez P, Semagn K, Beyene Y, Babu R, López-Cruz MA, San Vicente F, Olsen M, Buckler E, Jannink JL, Prasanna BM, Crossa J (2015) Genomic prediction in biparental tropical maize populations in water-stressed and well-watered environments using low-density and GBS SNPs. *Heredity* 114:291-299 doi: 10.1038/hdy.2014.99
 - Zhou J, Peng Z, Long J, Sosso D, Liu B, Eom J-S, Huang S, Liu S, Vera Cruz C, Frommer WB, White FF, Yang B (2015a) Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice. *Plant J* 82:632-643
 - Zhou X, Jacobs TB, Xue L-J, Harding SA, Tsai C-J (2015b) Exploiting SNPs for biallelic CRISPR mutations in the outcrossing woody perennial *Populus* reveals 4-coumarate: CoA ligase specificity and redundancy. *New Phytol* 208:298-301
 - Zhu T, Mettenberg K, Peterson DJ, Tagliani L, Baszczyński CL (2000) Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Nat Biotechnol* 18:555-558
 - Zhu T, Peterson DJ, Tagliani L, St Clair G, Baszczyński CL, Bowen B (1999) Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8768-8773

Un piano per lo sviluppo di biotecnologie sostenibili sulle principali colture italiane

Obiettivo del piano del Mipaaf è lo sviluppo di nuove varietà resistenti agli stress e alle malattie, ma a due condizioni di base: la conoscenza di genomi sequenziati e la possibilità di rigenerazione in vitro

A plan for the development of sustainable biotechnology

The objective of the plan, promoted by the Ministry of Agriculture, is the development of new varieties resistant to stress and disease, but on two conditions: the knowledge of sequenced genomes and the possibility of regeneration in vitro



Nel gennaio scorso il Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali ha stanziato 21 milioni di euro nella Legge di stabilità anche per il finanziamento del più importante progetto di ricerca pubblica fatto nel nostro Paese sul miglioramento genetico attraverso biotecnologie sostenibili.

Il piano è articolato su tre anni e coordinato dal Crea, il più importante ente di ricerca italiano sull'agroalimentare, vigilato dal Ministero delle politiche agricole, che studia i sistemi agricoli, le produzioni e gli alimenti e il loro impatto sull'uomo, dal seme alla tavola.

Coordina il progetto **Alessandra Gentile**, prorettore e professore ordinario di Arboricoltura all'Università di Catania, commissario straordinario del Crea dal 2015.

Biotecnologie sostenibili

Il Piano triennale prevede iniziative di ricerca in laboratorio, a legislazione vigente, con l'utilizzo di biotecnologie

come il genome editing e la cisgenesi. Questi strumenti possono consentire un impiego mirato del miglioramento genetico, senza alterare le caratterizzazioni del nostro sistema agroalimentare e migliorando le performance delle colture, soprattutto riguardo alla resistenza alle malattie.

“I ricercatori italiani sono già impegnati su questi fronti, ma fino ad oggi le risorse investite da parte del Governo per finanziare questi studi sono state limitate e frammentarie. – spiega Alessandra Gentile – Verranno così potenziati i filoni di ricerca già attivi e avviati nuovi percorsi sulle colture che caratterizzano di più l'agricoltura italiana. Per la maggior parte dei prodotti tuttavia servono ancora anni di studi in laboratorio, prima di poter arrivare alla fase sperimentale in campo”.

Casi di applicazione

Il tratto essenziale che caratterizza queste biotecnologie è

dato dalla possibilità di ottenere, in tempi più rapidi rispetto a quelli del breeding classico, genotipi molto simili a quelli originari. Questo perché si interviene in modo preciso sul gene endogeno target senza modificare le altre regioni genomiche e senza inserimento di elementi genici eterologhi.

“Con il Genome editing sono stati raggiunti alcuni risultati interessanti per riso, grano, mais, patata e altre specie, per quanto riguarda la resistenza ai patogeni e il miglioramento della qualità dei prodotti. Negli ultimi anni la cisgenesi è stata utilizzata per migliorare la resistenza a patogeni in melo e patata, modificare la forma e la crescita nel pioppo, ridurre il contenuto di acido fitico nell'orzo, migliorare la qualità delle proteine nel grano duro”.

Da questi presupposti parte il progetto del Crea, all'interno del quale lavorano alcune delle più importanti professionalità italiane nel campo della ricerca agroalimentare.

“Ora puntiamo a nuove varietà resistenti allo stress e alle malattie. Ma a due grandi condizioni: la conoscenza di genomi sequenziati e la possibilità di rigenerazione in vitro.

Infatti in Italia, pur conoscendo il patrimonio genetico di molte specie tipiche coltivate e, in alcuni casi, addirittura dell'intero genoma, siamo spesso costretti a importare dall'estero i materiali di propagazione. E così nei nuovi impianti finiamo per usare materiali genetici non sempre idonei ai nostri ambienti, con la conseguenza di ritardi nell'aggior-



Favorevoli le società scientifiche italiane

Su questo approccio si sono espresse favorevolmente le principali società scientifiche italiane: Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA), Società Italiana di Biologia Vegetale (SIBV), Società Italiana di Ortoflorofrutticoltura (SOI), Società Italiana di Agronomia (SIA), Società Italiana di Patologia Vegetale (SIPAV), Accademia dei Georgofili, Unione Nazionale delle Accademie per le Scienze Applicate allo Sviluppo dell'Agricoltura, alla Sicurezza Alimentare ed alla Tutela Ambientale (UNASA), Associazione Nazionale Biotecnologi Italiani (ANBI).

namento varietale, depauperamento delle risorse genetiche autoctone, ripercussioni sulla sostenibilità economica delle stesse produzioni”.

Biotecnologie sostenibili diverse da transgenico

“Tutte queste applicazioni potranno essere supportate attraverso la ricerca in laboratorio, in attesa che Bruxelles faccia chiarezza sulla diversità di queste biotecnologie rispetto al transgenico, aspetto che aprirebbe alla possibilità di sperimentazione in campo”.

L'Italia, insieme all'Olanda e diversi Stati membri, ha già sollevato più volte il tema all'interno del Consiglio dei Ministri dell'UE e la Commissione europea ha annunciato un primo documento tecnico al riguardo.

Diversi documenti redatti da organizzazioni scientifiche europee indicano che i prodotti delle tecniche di cisgenesi e genome editing non rientrano nella casistica degli OGM transgenici, dal momento che esse non sono diverse da quelle ottenibili attraverso un miglioramento genetico convenzionale. Gli Stati Uniti, ad esempio, hanno già dichiarato che le piante ottenute attraverso il genome editing non sono da considerare OGM - e allo stesso modo si è recentemente espressa anche la Svezia con riferimento a due specifici prodotti - ed è già stato redatto un parere dell'EFSA nel 2012 su richiesta dell'UE in cui si conclude che le piante ottenute per cisgenesi non presentano differenze rispetto a quelle costituite attraverso un normale processo di incrocio.

Il progetto riguarda le specie agrarie più importanti per il nostro sistema agroalimentare, e sarà gestito dal Crea con la partecipazione di diversi istituti di ricerca nazionali e la collaborazione con istituti internazionali, competenti per queste metodologie di intervento.

Superfici di colture da seme nelle campagne dal 2011 al 2015 (ettari)

SPECIE	2011	2012	2013	2014	2015	Variaz. % 2015/2014
AGLIO	33,85	28,86	30,35	29,59	31,14	5,24
AGROSTIDE TENUE	-	-	-	-		
AVENA	1.085,02	1.734,96	1.256,42	941,83	1380,6	46,59
AVENA FORESTIERA		125,99	295,53	10,00	2	-80,00
BARBABIETOLA DA FORAGGIO	126,13	61,95	74,30	140,91	211,54	50,12
BARBABIETOLA DA ZUCCHERO	4.395,39	3.728,28	2.584,26	3.483,04	2.938,68	-15,63
BROMO	-	-				
CANAPA (DIOICA)	12,65	16,76	22,54	36,41	89,88	146,86
CANAPA (MONOICA)					8,18	
CAROTA	-	-	-			
CARTAMO				8,05	14,05	74,53
CAVOLO DA FORAGGIO	0,75	2,00	1,50		1,00	
CAVOLO VERZA	-	-	-			
CECE	356,08	668,72	845,72	1.259,66	938,42	-25,50
CICORIA INDUSTRIALE	295,30	480,20	543,80	343,60	215,30	-37,34
CIPOLLA	-	-	-			
COLZA	128,07	84,51	219,90	195,45	75,30	-61,47
COTONE	-	-	-			
ERBA MAZZOLINA	10,00	-	-		1	
ERBA MEDICA	17.298,59	20.934,92	20.035,27	19.888,92	27.133,96	36,43
FACELIA	9,65	6,45	0,91	3,18	8,17	156,92
FARRO DICOCCO	139,04	176,06	72,27	106,63	146	36,92
FARRO MONOCOCCO	95,51	67,24	23,00	13,00	54,00	315,38
FAVA	1,90	24,65	41,40	58,03	47,29	-18,51
FAVINO	3.632,39	2.801,23	2.689,01	2.742,51	3.377,93	23,17
FESTUCA ARUNDINACEA	5,54	6,54	1,00	1,00	7,83	683,00
FESTUCA ROSSA	-	-	-			
FESTUCA PRATENSE	-	-	-			
FIENAROLA DEI PRATI	-	-	-			
FLEOLO	19,68	-	2,00			
FRUMENTO DURO	49.599,86	73.672,88	72.958,28	67.907,32	70948	4,48
FRUMENTO TENERO	20.888,21	25.707,33	27.859,15	27.497,56	24290,9	-11,66
GINESTRINO	73,56	65,65	16,54	32,20	18,49	-42,58
GIRASOLE	1.771,58	2.791,51	2.874,01	1.709,93	624,59	-63,47
IBRIDI SORGO PER ERBA SUDANENSE	17,64	29,74	53,76	38,54	12,15	-68,47
LATTUGA	-	-	-			
LENTICCHIA	0,10	-	-			

...segue

SPECIE	2011	2012	2013	2014	2015	Variaz. % 2015/2014
LINO DA OLIO	-	-	-	2,96		-100,00
LOIETTO IBRIDO	45,12	69,43	13,44		5,30	
LOIETTO ITALICO (*)	4.730,10	4.256,41	4.571,78	3.468,97	3.038,50	-12,41
LOIETTO PERENNE	23,88	81,77	42,22	3,55		-100,00
LUPINELLA	70,40	19,24	54,77	69,77	35,86	-48,60
LUPINO BIANCO	27,45	20,00	6,15	33,89	31,12	-8,17
LUPINO SELVATICO			2,00	12,22	13,00	6,38
MAIS	6.107,90	8.261,75	8.311,52	7.554,12	5.702,78	-24,51
NAVONE	2,70	7,30	4,00	9,00	4,00	-55,56
ORZO	7.770,18	9.441,12	9.424,01	8.377,52	8245,25	-1,58
PATATA	189,15	167,90	130,09	140,60	115,03	-18,19
PISELLO DA FORAGGIO	1.151,64	473,72	689,83	951,13	1.390,05	46,15
PLANTAGO LANCEOLATA	-	-	-			
PREZZEMOLO	-	-	-			
RAFANO OLEIFERO	9,00	5,00	23,80	47,50	64,50	35,79
RAPA	-	5,00	-			
RAVANELLO	-	-	-			
RAVIZZONE	-	1,00	-			
RISO	14.729,59	13.172,94	10.289,67	10.627,31	11.174,56	5,15
SEDANO RAPA	-	-	-			
SEGALE	359,67	344,32	419,27	415,10	526,8	26,91
SENAPE BIANCA	2,00	2,00	10,50	7,00	11,00	57,14
SENAPE BRUNA	13,00	23,00	38,46		35,83	
SOIA	8.178,70	6.339,28	8.631,32	10.102,38	11.787,60	16,68
SORGO	47,82	33,26	71,23	118,51	23,71	-79,99
SPELTA	2,00	8,00	10,09	68,80	60,37	-12,25
SULLA	161,85	183,98	63,00	75,78	59,01	-22,13
TRIFOGLIO ALESSANDRINO	6.333,14	6.951,52	10.462,01	13.087,74	13.420,83	2,55
TRIFOGLIO BIANCO	2,60	-	2,00*			
TRIFOGLIO IBRIDO	-	-	-			
TRIFOGLIO INCARNATO	1.277,36	1.210,93	1.607,29	1.436,41	1.499,73	4,41
TRIFOGLIO PERSICO	744,60	438,89	345,62	621,13	429,53	-30,85
TRIFOGLIO PRATENSE	154,16	105,64	113,21	195,02	224,90	15,32
TRITICALE	1.737,81	2.572,91	2.291,22	2.482,47	2401,14	-3,28
VECCIA COMUNE	3.461,66	1.415,53	1.862,40	2.251,76	2.373,96	5,43
VECCIA VELLUTATA o di Narbonne	55,79	106,03	102,62	108,55	107,78	-0,71
Totale generale	157.385,76	188.934,30	192.783,10	188.716,59	195.358,54	3,52

(*) Superficie controllata comprensiva di produzioni di secondo taglio

Quantitativi di sementi certificate nelle campagne dal 2010-11 al 2014-15 (tonnellate)

SPECIE	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	% 2015/2014
AGLIO	52,00	36,32	47,00	20,46	41,34	102,05
AGROSTIDE STOLONIFERA	0,59	0,36		1,60		-100,00
AGROSTIDE TENUE	3,41		2,02	1,70	5,94	249,41
AVENA	2.526,48	1.921,40	3.699,99	2.102,62	2.533,66	20,50
AVENA ALTISSIMA			6,72	12,00	5,00	-58,33
AVENA BIONDA			2,00	1,70	1,50	-11,76
AVENA FORESTIERA			146,25	180,00	117,45	-34,75
BARBABIETOLA DA FORAGGIO	210,30	171,26	95,88	77,30	129,75	67,85
BARBABIETOLA DA ZUCCHERO	4.508,12	14.445,71	8.525,95	5.597,24	6.564,22	17,28
BROMO						
CANAPA DIOICA	0,93	2,25	1,40	6,08	3,62	-40,46
CAVOLO DA FORAGGIO	9,53	0,59	0,95	1,04	0,15	-85,58
CAVOLO VERZA						
CECE	312,68	529,88	570,65	645,98	861,79	33,41
CICORIA INDUSTRIALE	126,90	197,70	170,15	457,00	170,22	-62,75
CODA DI VOLPE			2,00		2,17	
COLZA	84,91	114,46	131,49	154,80	213,37	37,84
COTONE						
ERBA MAZZOLINA	22,50	18,76	21,96	42,10	94,84	125,27
ERBA MEDICA	7.132,87	9.005,92	8.971,61	9.119,52	8.354,06	-8,39
ERBA MEDICA IBRIDA	24,00					
ERBA SUDANENSE	6,51	9,84	12,88	45,57	105,36	131,20
FACELIA	0,30	4,39	3,73	87,90	176,20	100,46
FARRO DICOCCO	130,78	243,23	71,68	150,20	85,30	-43,21
FARRO MONOCOCCO	14,20	31,50		25,90	10,00	-61,39
FAVA				37,00	90,00	143,24
FAVINO	5.276,99	4.599,85	4.497,42	4.146,13	4.675,87	12,78
FESTUCA INDURITA	102,03	80,40	53,70			
FESTUCA ARUNDINACEA			0,86	72,09	93,81	30,13
FESTUCA OVINA		1,52				
FESTUCA PRATENSE	20,00	1,50	111,00	53,88	67,40	25,09
FESTUCA ROSSA		5,07	8,52	13,98	1,95	-86,05
FLEOLO	78,50	88,25	28,70	33,17	29,00	-12,57
FRUMENTO DURO	150.114,52	167.242,42	205.367,51	190.167,56	196.369,91	3,26
FRUMENTO TENERO	111.514,81	115.940,26	130.278,30	125.036,89	117.533,89	-6,00
GINESTRINO	50,60	26,39	36,73	51,00	34,61	-32,14
GIRASOLE	1.754,28	2.672,89	2.222,08	2.982,92	3.416,99	14,55
IBRIDI DI FESTUCA PER LOLIUM		7,00	1,48			
IBRIDI SORGO PER ERBA SUDANENSE	69,57	122,39	125,76	197,91	382,50	93,27
LENTICCHIA						
LINO OLEAGINOSO						

...segue

SPECIE	2010-2011	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	% 2015/2014
LOIETTO IBRIDO	109,23	92,48	34,36	31,40	9,00	-71,34
LOIETTO ITALICO	8.641,13	8.503,99	7.739,05	7.232,32	8.945,88	23,69
LOIETTO PERENNE	125,32	210,10	135,42	124,04	84,45	-31,92
LUPINELLA IN GUSCIO	43,20	43,00	7,25	39,25	36,45	-7,13
LUPINELLA SGUSCIATA	39,00	19,50		13,40	4,00	-70,15
LUPINO BIANCO	24,00	21,20	29,23	22,78	59,05	159,22
LUPINO SELVATICO				2,38	17,84	649,58
MAIS	27.980,66	33.893,74	35.090,14	34.564,91	33.830,11	-2,13
MISCUGLI	10.159,08	9.805,94	9.083,91	9.571,12	10.016,26	4,65
NAVONE	4,74	1,48	5,05	2,33	8,49	264,38
ORZO	26.229,01	25.990,05	34.793,85	29.266,76	29.655,64	1,33
PATATA	1.658,61	1.511,87	863,46	1.124,56	1.163,54	3,47
PISELLO DA FORAGGIO	1.856,75	1.520,29	1.825,24	1.350,64	2.087,75	54,57
POA PRATENSE	1,14		10,98	4,88	35,75	632,58
RAFANO OLEIFERO	125,58	7,18	3,20	20,51	44,20	115,50
RAPA			4,20			
RAVANELLO						
RAVIZZONE			0,35			
RISO	60.074,08	56.644,35	43.602,81	43.033,30	42.475,39	-1,30
SEGALE	1.250,65	1.253,50	1.317,52	1.127,28	1.053,68	-6,53
SEMENTI COMMERCIALI	643,30	957,91	682,97	627,45	859,01	36,90
SENAPE BIANCA	2,23	1,52	2,47	4,23	41,36	877,78
SENAPE BRUNA	24,53	23,99	37,27	35,33	7,00	-80,19
SOIA	17.867,89	13.321,54	9.621,31	17.605,78	26.828,42	52,38
SORGO	296,26	293,25	317,09	285,66	692,93	142,57
SPELTA	-		17,38	16,63	50,70	204,87
SULLA IN GUSCIO	34,50		9,00			
SULLA SGUSCIATA	83,35	51,42	10,80	12,88	14,45	12,19
TRIFOGLIO ALESSANDRINO	3.554,79	3.544,44	3.060,90	5.235,15	6.007,14	14,75
TRIFOGLIO BIANCO	35,44	57,10	18,29	77,50	30,26	-60,95
TRIFOGLIO IBRIDO	21,20	14,45	26,70	0,40	2,00	400,00
TRIFOGLIO INCARNATO	1.310,81	1.290,65	947,92	1.243,01	1.084,13	-12,78
TRIFOGLIO PERSICO	362,40	475,98	325,53	271,98	375,08	37,91
TRIFOGLIO PRATENSE	200,08	172,12	291,70	360,97	340,01	-5,81
TRITICALE	5.331,74	6.895,44	11.659,51	11.442,94	10.492,90	-8,30
VECCIA COMUNE	5.392,74	5.314,84	3.021,34	2.350,48	2.717,05	15,60
VECCIA PANNONICA			29,38	3,88	20,00	415,46
VECCIA VELLUTATA e Narbonne	90,45	144,55	192,80	184,57	179,25	-2,88
TOTALE	457.722,20	489.599,38	530.034,75	508.813,94	521.441,04	2,48