

LA GENETICA VEGETALE SARÀ PRONTA PER ASSICURARE ALIMENTI ALLA POPOLAZIONE MONDIALE DEL 2050?

A. Michele Stanca

Riassunto

L'agricoltura non è mai stata tanto importante per l'umanità come all'inizio del XXI secolo. Basti pensare che attualmente circa 800 milioni di persone sono cronicamente malnutriti e che per 2 miliardi di esse non vi è sicurezza di approvvigionamento alimentare. A ciò si deve aggiungere la necessità di incrementare la produzione agricola per far fronte alla produzione di biomasse destinate alla produzione di energia rinnovabile. Il raggiungimento di questi obiettivi dovrà essere ottenuto senza convertire ad uso agricolo nuove superfici, visto che la risorsa "suolo" è in diminuzione a causa della continua urbanizzazione, dell'erosione, della salinità e dell'impellente necessità a livello mondiale, di proteggere le foreste. La crescente sensibilità dell'opinione pubblica verso la sicurezza e la salubrità degli alimenti e verso una maggiore compatibilità tra agricoltura e ambiente, nonché le preoccupazioni che derivano dal crescente fabbisogno energetico, dalle variazioni climatiche e dalla conseguente limitazione delle risorse idriche, mettono in luce una serie di problematiche la cui soluzione dipende dalle conoscenze che saremo in grado di accumulare sulle piante attraverso lo studio della struttura e funzione dei genomi vegetali (ricerca genomica).

Lo sviluppo di un'agricoltura sostenibile è strettamente legato alla riduzione dell'uso dei pesticidi e a una maggior efficienza nell'uso dei fertilizzanti, dei fitofarmaci e delle risorse idriche. Ciò richiede lo sviluppo di nuove varietà di piante con minori esigenze di fertilizzanti e dotate di resistenze genetiche verso gli agenti patogeni e i fattori di stress ambientale. Con le tecniche proprie dell'analisi genomica (uso estensivo di marcatori molecolari, sequenziamento dei geni e genomi, analisi globale dell'espressione genica, analisi del proteoma e delle sue modificazioni, analisi globale dei metaboliti) è possibile studiare i genomi, intesi come insieme di geni e proteine che interagiscono tra loro, e comprendere i meccanismi che regolano il metabolismo cellulare sino a determinare l'espressione fenotipica che rappresenta, in ultima analisi, il valore agronomico ed alimentare delle piante coltivate. Proprio la capacità della genomica di risalire alle basi genetiche dei caratteri agronomici rende questa scienza strategica per il miglioramento delle specie vegetali e per adattarle alle mutate esigenze del consumatore (alimenti più sicuri, di maggiore valore qualitativo e nutrizionale ecc) e della società (piante come fonti energetiche ed altri prodotti non-food).

Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento esponenziale delle conoscenze relative ai genomi delle piante (globalmente definite con il termine "genomica"). Attraverso l'uso di marcatori molecolari sono stati studiati i rapporti filogenetici tra le specie, è stata descritta la biodiversità, sono stati localizzati sul genoma geni utili al fine di un loro trasferimento guidato nelle varietà coltivate.

Parole chiave: Genetica vegetale, Miglioramento genetico, Genomica, Editing genomico, Potenzialità produttiva.

Abstract

Domesticated plants have been crucial to the development of mankind providing a regular staple source of food compounds – carbohydrates, proteins, fat and secondary metabolites – since their domestication 12,000 years ago. Historically, genetic studies have their foundations in Mendelian mutants, characterized by altered physiology and/or morphology. In this regard there are examples of morphological mutations described in the past for which the gene/genes responsible have been recently cloned, characterized and used. An example is the Rht-B1b gene that controls plant height in wheat, which induces semidwarf plants due to the effect of a single nucleotide mutation capable of converting the majority of sugar into grain starch. With this model the source-sink relationship has been studied in depth and new varieties based on the concept of "Improved Harvest Index" have been released with an impressive grain yield enhancement in a wide range of environments. The question is: "Can we produce and supply sufficient food in the next 40 years without consuming more land?" On the basis of modern plant science, particularly by the introduction of genomic studies, the answer is positive. Selection is specifically directed to create highly tolerant and/or resistant genotypes to increase the "High Yield Potential and Stability of Yield" and to reduce the gap between high yield potential and the actual yield.

Keywords: Plant Genetics and Breeding, Genomics, Genome Editing, Yield Potential.

Nota per il lettore:

Per facilitare la lettura del presente lavoro si è preferito organizzarlo in due parti distinte ma fortemente concatenate. Nella prima si segue il percorso che va dall'addomesticamento delle piante alla loro utilizzazione da parte dell'uomo, per la produzione di alimenti e l'ottimale utilizzazione del suolo da coltivare, fino all'applicazione delle leggi di Mendel. Nella seconda parte viene descritto il ruolo che la genetica vegetale e le tecnologie genomiche oggi disponibili potranno giocare per garantire all'uomo e agli animali in allevamento il fabbisogno alimentare ed energetico per i prossimi 40 anni.

Introduzione

Sul Pianeta Terra attualmente circa 1 miliardo di persone – 15 milioni in Nazioni industrializzate, 53 in America Latina, 42 in Medio Oriente e Nord Africa, 265 nell’Africa Sub-Sahariana, 642 in Asia e Pacifico – sono cronicamente malnutrite, e per altri 2 miliardi non vi è sicurezza di approvvigionamento alimentare (Nature Biotechnology, 2012). A ciò si deve aggiungere la necessità di incrementare la produzione di biomasse da destinare ad energia rinnovabile. Il raggiungimento dell’autosufficienza alimentare dovrà avvenire senza dover convertire ad uso agricolo nuove superfici, anzi la risorsa “suolo” è in diminuzione a causa della continua urbanizzazione, dell’erosione, della salinità e dell’impellente necessità, a livello mondiale, di proteggere le foreste. La produzione di cibo in regime di sostenibilità è strettamente legata alla riduzione dell’uso dei pesticidi e ad una maggiore efficienza nell’uso dei fertilizzanti, dei fitofarmaci e delle risorse idriche. Ciò richiede lo sviluppo di nuove varietà di piante rispondenti a queste caratteristiche e dotate di resistenze genetiche verso gli agenti patogeni e i fattori di *stress* ambientale. L’ottenimento di piante resistenti alle malattie costituisce anche un mezzo per la riduzione sistematica dell’uso di fitofarmaci e, nello stesso tempo, del rischio di accumulo di sostanze tossiche (micotossine).

La crescente sensibilità dell’opinione pubblica verso la sicurezza e la salubrità degli alimenti e verso una maggiore compatibilità tra produzione di alimenti e ambiente, nonché le preoccupazioni che derivano dal crescente fabbisogno energetico, dalle variazioni climatiche e dalla conseguente limitazione delle risorse idriche, mettono in luce una serie di problematiche la cui soluzione dipende dalle conoscenze che saremo in grado di accumulare sulle piante attraverso la genetica vegetale e le discipline ad essa collegate.

La storia evolutiva dell’uomo mette in evidenza come queste strategie sono state perseguite a partire dagli albori della nostra civiltà. Le piante, infatti, direttamente o indirettamente, hanno garantito il cibo per l’uomo e gli animali domestici quando da cacciatore-raccoglitore impara ad addomesticare le piante e 12.000 anni or sono realizza la più importante rivoluzione della storia: *quella neolitica*.

Addomesticamento, formazione delle popolazioni vegetali e biodiversità

La selezione di specie sottratte alla selezione naturale e introdotte in coltivazione viene definita *Addomesticamento* ed ha rappresentato il primo

intervento dell’uomo verso la nascita dell’agricoltura.

È noto, infatti, che in cinque grandi centri di origine, 12000 anni or sono, intorno a orzo, frumento, mais e riso, la specie umana inventa la più importante attività che ci ha accompagnato nella nostra storia evolutiva e ci accompagnerà all’infinito: l’agricoltura. Cosa era successo in quel preciso momento? C’è stato un passaggio di era, dal tardo paleolitico (uomo cacciatore-raccoglitore) al *Neolitico*, durante il quale l’uomo/donna mette a punto la tecnologia per coltivare piante che già usava nella sua dieta, perché presenti nell’ambiente circostante, si nutre dei loro prodotti ed evita così di esercitare esclusivamente l’attività pericolosa della caccia (Stanca, 2015).

Da cacciatore ad agricoltore: la conoscenza della semina, della raccolta e della conservazione viene applicata con l’obiettivo preciso di procacciarsi il cibo senza correre rischi per sé, la sua famiglia, la sua tribù. È interessante che questa innovazione si sia sviluppata indipendentemente nei diversi centri di origine e probabilmente determinata da un unico evento: si stava concludendo l’ultima glaciazione. Mano a mano che i ghiacciai si ritiravano, nuove specie erbacee e arboree si svilupparono e le abitudini alimentari cambiarono radicalmente. Le graminacee progenitori di orzo, frumento, mais e riso diventarono le più frequenti nella flora spontanea e vennero usate dal cacciatore-raccoglitore tal quali prima e coltivate poi. La disponibilità di cibo e di nuove terre a seguito del ritiro di ghiacciai favorirono l’espansione della popolazione umana, che raggiunse circa 5.000.000 di persone su tutto il pianeta.

Tutto ciò si realizza, per noi europei, nella Mezzaluna Fertile, regione nella quale la nostra civiltà compie i primi passi intorno a frumento e orzo e in cui nello stesso tempo vengono applicate tutte le tecnologie innovative via via sviluppate. Nella aree circostanti la Rivoluzione Neolitica non si è ancora diffusa. È stato messo in evidenza che l’assenza di progenitori selvatici di orzo e frumento in Europa ha fatto sì che l’agricoltura raggiungesse i paesi scandinavi con un ritardo di 4000 anni. La diffusione di questa tecnologia, partendo dalla Mezzaluna, è stata calcolata pari a 1,1 km/anno. Anche l’Italia non ha conosciuto un Neolitico indigeno, ed è stata colonizzata seguendo due principali percorsi: il Mediterraneo e il Danubio, attraverso la Svizzera (Cavalli Sforza, 2005).

La diffusione dell’agricoltura dalla Mezzaluna Fertile percorse tre grandi strade: mediterranea, danubiana e nord asiatica. Si può ipotizzare quindi che siano stati gli agricoltori più evoluti a muoversi e a disseminare queste tecnologie, colonizzando nuove terre,

oppure che, attraverso la diffusione delle conoscenze e delle tecniche, gli europei abbiano importato e adottato dai loro vicini l'agricoltura che mano a mano si andava sempre più estendendo. L'abbondanza di alimenti stimolò nell'uomo del Neolitico la ricerca di un sistema di conservazione dei prodotti agricoli: l'uomo imparò a cuocere l'argilla e a costruire i primi grandi vasi di terracotta proprio per la conservazione delle granaglie e dei liquidi. Questa tecnologia, benché nata in ritardo di qualche millennio rispetto all'agricoltura, si sviluppò molto più velocemente tra le diverse popolazioni. Proprio in questa seconda fase si scoprono, casualmente, anche i primi prodotti trasformati: birra e pane. Questa "tranquillità" alimentare favorì ulteriormente l'incremento demografico, che a sua volta ha favorito le migrazioni verso nuove terre sino alla formazione delle prime città.

L'orzo e il frumento selvatici a quel tempo coltivati avevano la caratteristica di disperdere i semi: la spiga a maturazione si disarticolava ad ogni nodo del rachide, lasciando cadere i singoli chicchi in posizioni diverse sul terreno, così favorendo la crescita e maturazione delle nuove piante, avvantaggiate in ecosistemi naturali nella competizione con altre specie. Se dal punto di vista evolutivo questa strategia sviluppata dalla pianta rappresentava una valvola di sicurezza per la sopravvivenza della specie, dal punto di vista della produzione di cibo costituiva un

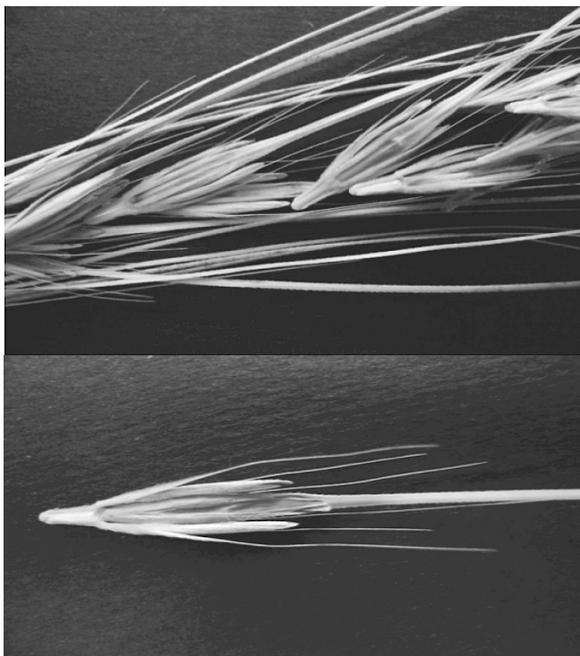


Fig. 1. Spiga fragile di *Hordeum spontaneum*. È evidente la disarticolazione, a maturazione, delle singole spighette, che facilita la dispersione dei semi.

punto debole, portando alla perdita totale del raccolto nel caso di improvvise calamità naturali (vento, pioggia). Il più grande salto scientifico-tecnologico si ebbe quando tra le piante di orzo selvatico si scoprì e si coltivò una spiga non fragile. Fu la prima trasformazione genetica utile registrata nella storia (Fig. 1) (Stanca, 2017).

La genetica che sottende questo carattere fondamentale della domesticazione è stata recentemente chiarita. In orzo, i due geni responsabili del carattere "spiga non fragile" sono *Btr1* e *Btr2*, strettamente associati sul cromosoma 3H, mentre in frumento svolgono un ruolo maggiore *brittle rachis 2* (*Br-A1*) e *brittle rachis 3* (*Br-B1*), rispettivamente posizionati sul braccio corto dei cromosomi 3A e 3B. Nell'insieme, sembra che in tutte le *Triticeae* siano presenti questi geni che controllano la disarticolazione in diversi punti della spiga. Un altro esempio è il gene *sh4* di riso, che codifica per un fattore trascrizionale responsabile della formazione del tessuto di abscissione alla base del peduncolo che regge il granello sulla pannocchia di riso. Nel riso coltivato la mutazione di un singolo nucleotide, che determina la sostituzione di una Lisina con una Asparagina, è sufficiente per ridurre lo sviluppo del tessuto di abscissione in modo tale da impedire la caduta spontanea dei semi, consentendo tuttavia il distacco dei semi a seguito di sollecitazione meccanica.

Nel processo di addomesticamento una caratteristica tenuta in gran conto è stata la dimensione dei frutti. Uno degli esempi più significativi è quello dell'olivo, con la transizione dalla forma selvatica – oleastro – ad olivo coltivato da olio, che si caratterizza per l'incremento notevole delle dimensioni del frutto (drupa), processo verosimilmente controllato da poche mutazioni semplici (Fig. 2).

Una profonda modifica dell'architettura della pianta e della morfologia della spiga del mais è stata causata dal gene *Teosinte branch1* (*Tb1*) che controlla lo sviluppo delle gemme laterali, determinando nel progenitore selvatico del mais (il teosinte) lunghe ramificazioni laterali terminanti con una infiorescenza maschile e numerosi germogli basali, caratteristiche assenti nel mais coltivato. *Tb1* codifica per un fattore trascrizionale che agisce da repressore dello sviluppo dei germogli laterali, imponendo una dominanza apicale.

Anche in specie orticole è stato molto evidente l'effetto di singole mutazioni su caratteristiche fondamentali dell'architettura della pianta e qualità dei frutti. In pomodoro, significativi sono stati gli effetti di alcuni geni, tra cui *self proning*, che trasforma lo sviluppo della pianta da indeterminato (ininterrotta crescita dell'apice vegetativo) a determinato (la crescita

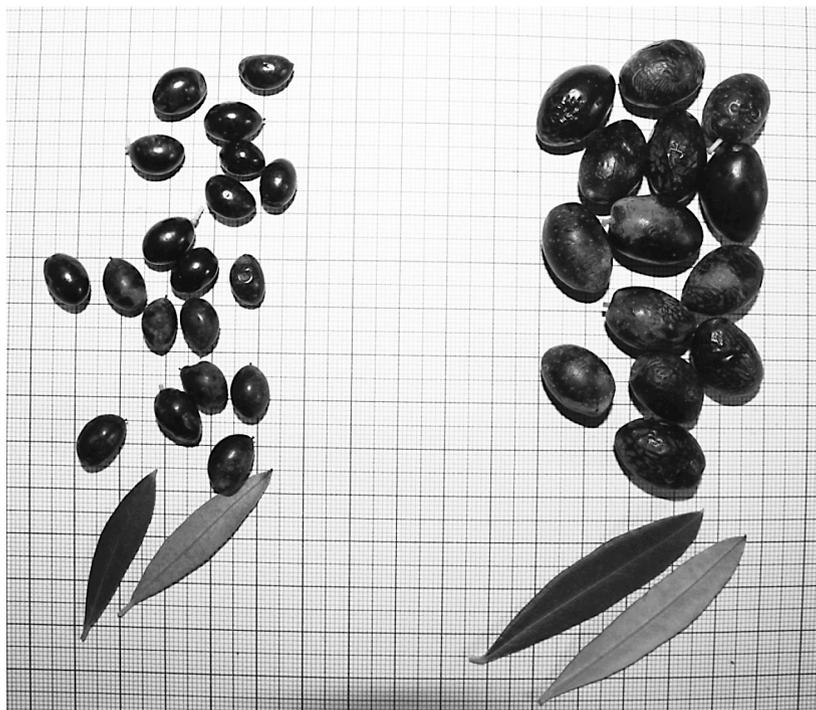


Fig. 2. Diversa dimensione della drupa e delle foglie di oleastro (*Olea europaea* sbsp *sylvestris*, a sinistra) e di olivo (*Olea europaea* sbsp *sativa*, a destra). Cortesia L. Stanca

dell'apice vegetativo viene bloccata, ottenendo piante a sviluppo contenuto) e *jointless*, che controlla il sistema di disarticolazione della bacca dal peduncolo.

La bacca di pomodoro può assumere una varietà di colorazioni, che vanno dal giallo pallido al viola intenso, sino alla più recente scoperta dei mutanti a bacca nera: responsabili di questo fenomeno sono mutazioni in geni singoli, quali *yellowflesh* (giallo), *dark green* (rosso intenso), *green flesh* (viola), *u* (uniformemente verde), *sun black* (nero), quest'ultimo regolato da due geni, *Aft* e *Atv* (Bai e Lindhout, 2007; Gonzali *et al.*, 2009).

Negli agrumi quasi tutta la variazione naturale nella pigmentazione da antocianine, causata da mutazione puntiforme, delezioni e inserzioni di elementi trasponibili, può essere spiegata da differenze nell'attività del gene *Ruby* (Butelli *et al.*, 2017). In pisello una mutazione puntiforme al gene *af* determina la trasformazione delle foglie in cirri.

La fase di addomesticamento continuò portando in coltura altre specie come lenticchia, fico, e parallelamente si cominciarono ad addomesticare gli animali come pecora, capra, bovini, suini e successivamente il cavallo. Con l'addomesticamento degli animali, la dieta si diversifica completamente e si completa. I binomi cereali-leguminose, cereali-latte e cereali-carne rappresentano la migliore combinazione nutritiva.

Oggi sappiamo perché: la cariosside di un cereale mediamente è composta dal 65-75% di amido, 8-20% di proteine, 3-8% di grassi. La proteina però ha un valore biologico scarso perché carente di due aminoacidi, lisina e triptofano, motivo per cui anche nella dieta moderna i cereali si complementano con altri alimenti ricchi di proteine nobili.

Queste innovazioni tecnologiche provocarono un aumento della quantità di cibo e conseguentemente la crescita della popolazione sulla Terra.

La formazione delle popolazioni vegetali

Dopo la fase iniziale di addomesticamento, l'interazione tra la selezione naturale e una selezione antropica empirica ha portato allo sviluppo di popolazioni adattate ai diversi ambienti di coltivazione, note come *landraces*.

Una volta che la coltivazione è stata stabilita, altri adattamenti si sono evoluti in risposta alla raccolta ed alla competizione tra piante. Si sono selezionate popolazioni con frutti e semi di dimensioni maggiori, vigore dei culmi, sincronizzazione dei tempi di germinazione e maturazione. Si è stabilito quindi un continuum tra le nuove *landraces* e i loro progenitori selvatici, che ha favorito eventi di introgressione, de-

rivati da incrocio casuale e conservazione di caratteri favorevoli, con specie selvatiche imparentate, ma anche eventi di ricombinazione frequenti o sporadici a seguito di incroci casuali. Tutte le mutazioni accumulate durante la storia evolutiva delle specie selvatiche e addomesticate rappresentano la biodiversità disponibile oggi sul pianeta e quindi un salvadanaio di geni utili. L'importanza della conservazione e valorizzazione del germoplasma vegetale, quale fonte naturale per il mantenimento della biodiversità, è stata definita strategica per il futuro dell'umanità a partire dalla Conferenza Internazionale sulla Biodiversità, tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992. In realtà l'uomo è da sempre "cacciatore di piante": lo dimostrano le prime spedizioni egiziane datate tra il 3000 e il 1500 a.C. alla ricerca di piante medicinali e aromatiche; lo confermano le spedizioni botaniche che hanno cambiato il mondo agricolo degli ultimi secoli. Grandiosa è stata l'opera di Teofrasto, che ha descritto il mondo vegetale in nove volumi. L'Impero Romano ha contribuito in modo determinante alla diffusione di un imponente patrimonio biologico nei territori controllati ed ha affinato una moderna tecnologia agronomica di base ed applicata, i cui effetti sono ancor oggi di riferimento (Columella, trad. 1977); ma è stata la relazione con i Paesi dell'Estremo Oriente prima e la scoperta dell'America poi a determinare il più importante flusso di specie vegetali a livello planetario che, gradualmente,

hanno provocato un radicale cambiamento nella dieta degli europei (mais, patata, pomodoro, fagiolo, ecc.).

L'uomo ha inoltre sempre portato con sé nei suoi spostamenti le piante che coltivava, determinandone quindi gli areali di diffusione. Il tema della biodiversità è perciò da sempre al centro delle attenzioni del mondo scientifico. Il bilancio attuale stima che circa 220000 siano le specie vegetali rilevanti presenti sul pianeta (mono e dicotiledoni), di cui 5000 usate dall'uomo per i propri fabbisogni e 1500 addomesticate. Solo 150 vengono oggi impiegate in modo significativo, ma ciò che colpisce è che 4 sole specie cerealicole forniscono il 60% delle calorie alimentari (Fig. 3). Di queste quattro specie si dispone presso diversi laboratori di centinaia di migliaia di ecotipi, *landraces*, varietà. L'Italia contribuisce a questo patrimonio naturale con 6700 specie vegetali. La variabilità naturale e le risorse genetiche rappresentano il deposito di geni da cui attingere per raggiungere ulteriori progressi attraverso l'accumulo di alleli utili. Con la conservazione *in situ* (cioè negli ambienti naturali dove può essere possibile l'alloincrocio tra la specie addomesticata con le specie selvatiche), *on farm* (cioè mantenendo in coltivazione le varietà locali) e/o *ex situ* (cioè in ambienti controllati, in cui non esistono gli ancestrali) l'accumulo di geni è valorizzato, in quanto fonte di caratteri utili per il miglioramento varietale (<http://www.bioversityinternational.org/>). È chiaro

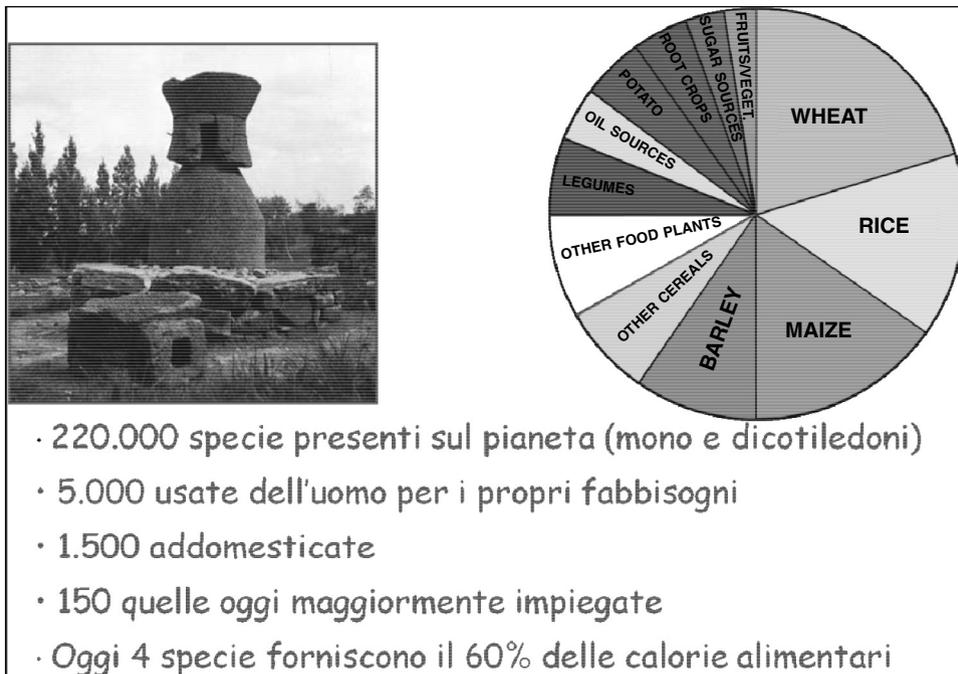


Fig. 3. A sinistra: molino per cereali del periodo romano. A destra: specie che vengono utilizzate dall'uomo per i propri fabbisogni. Frumento, riso, mais e orzo forniscono il 65% delle calorie e il 50% delle proteine.

come la conservazione *ex situ* sia processo statico, in cui non c'è ricombinazione genica, mentre nella conservazione *in situ* è assicurato un processo dinamico di flusso genico.

La conservazione *ex situ* (soprattutto di semi, ma anche di tuberi, polline, parti di pianta, spore ecc.) deriva dalla constatazione che la sola conservazione *in situ* non riesce ad evitare la perdita di biodiversità, a causa delle pressioni antropiche, del degrado ambientale, dei cambiamenti climatici, della competizione con specie più invasive. Deriva inoltre dalla necessità di una raccolta e conservazione dei genotipi e organizzazione dei dati relativi nel modo più razionale, così da consentire un facile accesso per chi opera nei campi della genetica vegetale e della ricerca in generale. È questa la forma di conservazione più diffusa: si stima infatti che, a livello mondiale, poco meno del 90% del germoplasma di specie agrarie sia conservato *ex situ*. Recentemente si sono avviate anche attività di conservazione della flora rara, minacciata, endemica e protetta. A questo proposito sono nate e cresciute banche e associazioni per la conservazione del germoplasma insieme a collezioni particolari disponibili presso vari enti. Veramente rilevante è il numero di genotipi presenti nelle diverse collezioni a livello mondiale: si stima infatti che la cifra globale sia di circa 7,4 milioni di accessioni, comprendendo specie coltivate e specie selvatiche, affini o non affini alle coltivate. A livello europeo i maggiori enti deputati alla conservazione delle risorse genetiche si sono consorziati nell'ECPGR (*European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources*) con lo scopo di promuovere azioni comuni e armonizzare gli

approcci di conservazione e descrizione (<http://www.ecpgr.cgiar.org/>) (Tab. 1).

I punti critici della conservazione di semi sono la temperatura e l'umidità. Molte specie presentano infatti semi "ortodossi", che tollerano la deumidificazione fino a livelli del 3-7% e possono essere conservati a temperature basse (tra 0 e -20 °C). Recentemente è stata attivata una nuova struttura per la conservazione "long term" a bassa temperatura nelle isole Svalbard (Norvegia) (Fig. 4) (Westengen *et al.*, 2013).

Circa l'1% delle risorse genetiche è invece conservato *in vitro*, tecnica utilizzata per specie a propagazione vegetativa o caratterizzate da semi "non ortodossi", impossibili da essiccare e conservare efficacemente a basse temperature. Ancora più rare sono le collezioni conservate a bassissime temperature (-196 °C), incluse le banche di DNA. Per le diverse specie agrarie sono conservate quindi sia "collezioni di base", che comprendono la maggior parte della variabilità genetica esistente a livello mondiale, sia *Core Collections*, "collezioni di lavoro" immediatamente fruibili.

La gestione di queste collezioni prevede la determinazione della dimensione minima di un campione, l'ottimizzazione delle tecniche di conservazione (ovviamente differenti nel caso di semi, tuberi, di piante autogame o allogame, erbacee o arboree) e la definizione dei passaporti descrittivi.

Tra le diverse collezioni di germoplasma presenti sul territorio italiano, spicca senz'altro l'olivo, specie allogama di grande interesse per gli ambienti mediterranei, caratterizzata da una variabilità genetica molto elevata legata al fatto che la specie non ha subito ero-

Tab. 1. Specie vegetali per le quali sono disponibili le maggiori collezioni di germoplasma a livello mondiale. (Dati FAO 2010).

Pianta	Genere	Numero di accessioni
Frumenti	Triticum	856.168
Riso	Oryza	773.948
Orzo	Hordeum	466.531
Mais	Zea	327.932
Fagiolo	Phaseolus	261.963
Sorgo	Sorghum	235.688
Soia	Glycine	229.944
Avena	Avena	130.653
Arachide	Arachis	128.435
Cotone	Gossypium	104.780



Fig. 4. Tunnel della Banca del Germoplasma nelle isole Svalbard (Norvegia) per la conservazione a lungo termine di specie vegetali e varietà entro-specie.

sione genetica specifica, e che si tratta di una pianta longeva e resistente.

Si stima che il numero totale delle varietà di olivo coltivate nel mondo sia di circa 1300, a cui si aggiungono oltre 3000 ecotipi locali e le popolazioni di olivo selvatico presenti lungo tutta l'area subcostiera mediterranea. L'Italia ha uno straordinario patrimonio genetico di questa specie e raccoglie più del 40% dell'intero germoplasma coltivato, oltre a centinaia di varietà minori, ecotipi locali ed esemplari millenari (Fig. 5), oggi minacciati nel Salento dal batterio *Xylella fastidiosa*.

Altre importanti collezioni di germoplasma sono relative alla vite, con più di 1500 vitigni, ai cereali e alle leguminose da granella, ospitate presso il CNR-Istituto del Germoplasma di Bari. Le collezioni di mutanti dello sviluppo rappresentano una sorgente inesauribile per studi di genetica di base e miglioramento genetico (Fig 6) (Pozzi *et al.*, 2000, Terzi *et al.*, 2017).

Attualmente la genomica utilizza in modo nuovo le risorse genetiche, tant'è vero che le banche del germoplasma spesso affiancano alle loro collezioni banche del DNA. Gli avanzamenti della genomica hanno aperto infatti nuove prospettive alla genotipizzazione delle diverse popolazioni, per l'identificazione di geni che controllano caratteristiche fenotipiche semplici o complesse.



Fig. 5. esemplare di olivo secolare a Soletto (Lecce). *Cortesia L. Stanca*

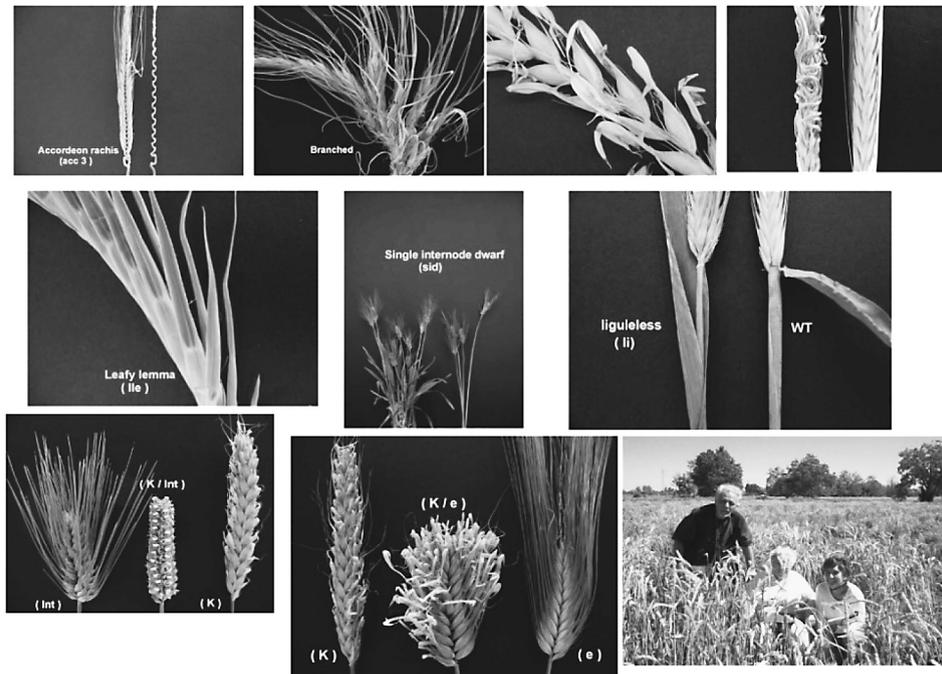


Fig. 6. Mutanti della spiga e del culmo di orzo.

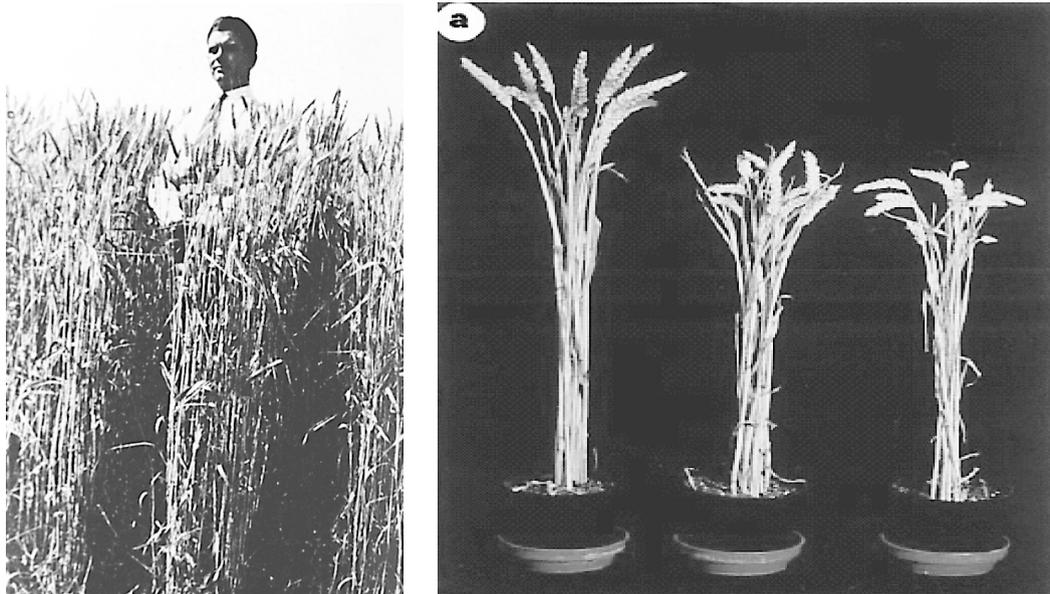


Fig. 7. Variazione dell'altezza della pianta di frumento: a sinistra varietà pre-mendeliane, a destra varietà a bassa taglia oggi in coltivazione.

L'identificazione di geni singoli, ma soprattutto di QTL (Quantitative Trait Locus: una regione di DNA associata ad un particolare carattere quantitativo), richiede una popolazione di piante geneticamente variabile per il carattere in esame, sistemi di marcatori per la genotipizzazione della popolazione, metodologie di fenotipizzazione efficaci e precisi, approcci metodologici e statistici appropriati per gli studi di associazione.

La fenotipizzazione del germoplasma e di materiali genetici particolari rappresenta probabilmente una fase critica nel processo di valorizzazione e utilizzo di risorse genetiche. Grande e rinnovata attenzione viene riservata a questa attività, anche attraverso lo sviluppo di sistemi automatizzati – piattaforme – per la valutazione di diversi parametri fisiologici e morfologici in condizioni di alta standardizzazione. Oggi i singoli genotipi sono dotati di passaporti morfologici, fisiologici e molecolari. Il tentativo per valorizzare il germoplasma “d'epoca” (genotipi pre-Mendel e sino al 1950), è considerato ormai superato dal punto di vista scientifico. Infatti la reintroduzione in coltivazione di questi genotipi, specialmente nel settore cerealicolo, ha confermato quanto già noto: scarsa produttività e nessun vantaggio qualitativo rispetto alle varietà moderne. Come già detto, le varietà “d'epoca” conservate nelle banche del germoplasma, saranno sempre impiegate come fonti di resistenza alle malattie, per caratteri qualitativi o nutrizionali e per metaboliti secondari per alimenti funzionali.

La nascita della genetica

Nella fase pre-mendeliana, l'interazione tra la selezione naturale e una selezione antropica empirica ha portato, come già detto, allo sviluppo di popolazioni adattate ai diversi ambienti di coltivazione note come *landraces*. Tuttavia queste *landraces*, dal periodo romano agli inizi del '900, non hanno provocato significativi incrementi produttivi per unità di superficie. Con la riscoperta delle leggi di Mendel, le prime conoscenze sulla genetica dei caratteri quantitativi e la scoperta dell'eterosi, si è affermata una vera attività di miglioramento genetico, che nel giro di pochi decenni ha radicalmente modificato la capacità produttiva e le caratteristiche qualitative delle piante coltivate (Fig. 7).

La genetica vegetale, madre di tutte le genetiche, ha consentito di approfondire le conoscenze sulla definizione dell'ereditarietà dei caratteri e nello stesso tempo ha permesso di sviluppare tecnologie nelle piante coltivate capaci di accumulare geni utili, originariamente dispersi nelle popolazioni, in genotipi superiori. Si avvia così un'intensa attività di miglioramento genetico, all'inizio del secolo scorso, che ha portato in tutte le specie coltivate allo sviluppo di nuove varietà sempre più produttive e sempre più rispondenti alle esigenze della moderna società. In generale, nell'ultimo secolo nella maggior parte dei Paesi si sono registrati, per tutte le specie coltivate ed in particolare per i cereali, incrementi produttivi sorprendenti: grazie all'italiano Strampelli prima e

all'americano Borlaug dopo, i guadagni produttivi attribuibili al progresso genetico sono compresi tra 20 e 50 kg ha⁻¹ per anno (Fig. 8). Questi cambiamenti sono associati ad importanti modificazioni dell'architettura e della fisiologia della pianta, come evidente in orzo e frumento, in cui la riduzione dell'altezza della pianta,

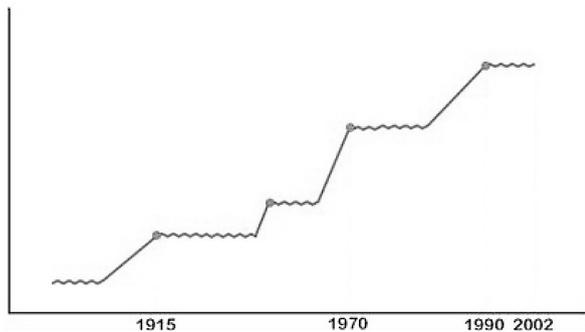


Fig. 8. Modello del progresso genetico in specie vegetali a partire dal 1900 fino ai giorni nostri. I cerchi indicano le varietà rappresentative del momento storico.

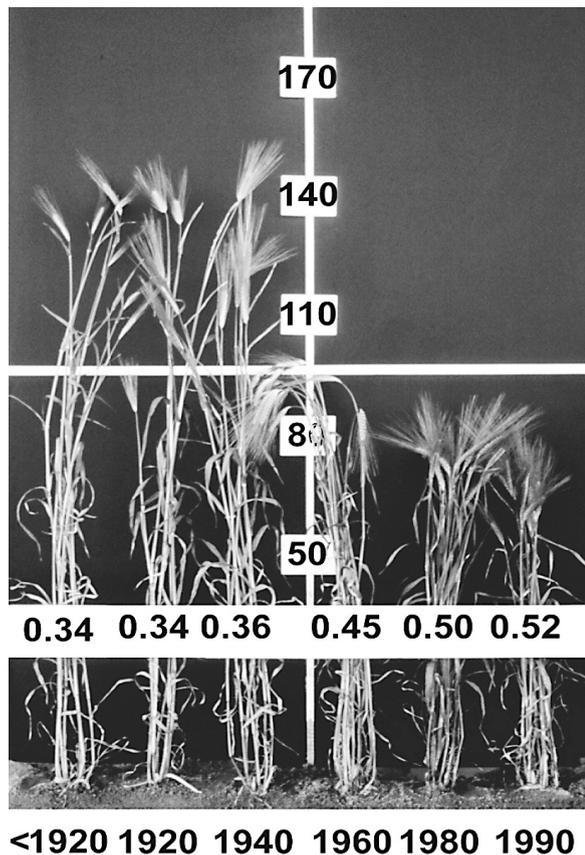


Fig. 9. Riduzione della taglia della pianta di orzo dal 1920 ad oggi, e miglioramento dell'Indice di raccolto HI (Harvest Index).

accompagnata da una maggior efficienza nell'assorbimento e nel trasporto, si è rivelata indissolubilmente collegata all'aumento dell'*Harvest Index* (indice di raccolto $HI = \text{biomassa utile/biomassa totale}$) (Fig. 9).

Per ridurre l'altezza della pianta e quindi limitare o eliminare le perdite dovute al fenomeno dell'allettamento (perdita della posizione verticale del culmo in seguito ad avversi eventi meteorici) si fece ricorso ai geni della bassa taglia del frumento.

Questo grave fenomeno aveva sempre danneggiato le produzioni di granella non solo dal punto di vista quantitativo, ma anche qualitativo. Le varietà coltivate sino all'inizio del XX secolo erano di taglia elevata (180 cm o più) e quindi facilmente soggette all'allettamento. Quando questo fenomeno si verificava precocemente, la pianta di frumento non aveva la capacità di recuperare la posizione eretta, e per diversi motivi tutta la fisiologia della relazione *source* (fotosintesi)-*sink* (accumulo dei fotosintati nel frutto) era alterata, con la conseguente produzione di cariossidi striminzite e malate. Comunque la potenzialità produttiva di quel modello di pianta era molto bassa: nelle condizioni migliori e in assenza di malattie non superava 2 t/ha.

Nel 1911 Nazareno Strampelli per primo introdusse il carattere bassa taglia – *dwarf* – nei frumenti usando nei suoi incroci il genotipo giapponese AKAGOMUKI, portatore del gene *Rht8* sensibile alle gibberelline. Lo sviluppo di nuovi genotipi a bassa taglia rappresenta il grande successo italiano nel mondo. Le varietà di Strampelli sono state impiegate in quasi tutti i programmi di *breeding* in tutto il mondo sino a pochi anni or sono. Anche Cesare Orlandi utilizzò un'altra varietà a taglia bassa – SAITAMA 27 – portatrice del gene *Rht-B1d* insensibile alle gibberelline. Successivamente un'altra varietà giapponese, NORIN 10(6x), portatrice di un altro gene di bassa taglia *Rht-B1b* insensibile alle gibberelline, isolata per la prima volta nel 1932, fu introdotta nel 1946 da Orville Vogel nella Washington State University, e nel 1948 fu eseguito il primo incrocio. Norman Borlaug utilizzò Norin 10 nel 1955 per gli incroci, e nel 1964 avviò il nuovo programma di miglioramento genetico presso il CIMMYT (Messico), dal quale origina e si realizza la "Rivoluzione Verde", che gli porterà nel 1970 il premio Nobel per la pace.

Va chiarito che il successo di questi nuovi genotipi a bassa taglia non derivò soltanto dall'eliminazione dei danni da allettamento, ma anche dagli effetti pleiotropici di questo gene. In pratica la presenza di *Rht-B1b* permette alla pianta di aumentare l'apparato fotosintetico, migliorare la fertilità della spigetta, il numero di spigette per spiga, il numero di spighe/m² e la dimensione della cariosside. Tutto ciò ha portato a

un aumento della produzione pari a 4-5 volte il potenziale delle varietà pre-Strampelli (fino a 10-12 t/ha). Nel mondo l'incremento produttivo è stato notevole e si prevedono ancora progressi sostanziali sia in ambienti fertili che in ambienti stressati.

Con il gene *Rht-B1b* fu possibile programmare un nuovo ideotipo di pianta, basato sull'Harvest Index. Di fatto la potenzialità di biomassa totale non è cambiata tra i genotipi non *dwarf* e *dwarf*. È solo cambiato l'HI e ciò dimostra che tutta la genetica dei *dwarf* ha migliorato la relazione *source-sink* ed ha equilibrato il rapporto assorbimento/fotosintesi e trasporto/accumulo dei fotosintati nei siti definitivi.

Il modello di pianta, il cosiddetto "Ideotipo", nel quale deve instaurarsi un ottimale rapporto tra sorgente di energia "fotosintesi" e siti di accumulo (frutto) è stato esportato ed applicato in altre specie vegetali. Al miglioramento genetico classico si è affiancata la mutagenesi sperimentale per l'ottenimento di nuove varietà. La mutagenesi indotta nel settore vegetale ha un ruolo di rilievo non solo per lo studio delle funzioni geniche, ma anche, soprattutto in un recente passato, per indurre variabilità genetica da cui selezionare nuovi genotipi di potenziale interesse agrario. Con questa tecnologia, negli anni '60-'70 sono state rilasciate diverse nuove varietà di specie erbacee, arboree e ornamentali.

Eterosi in Pianta Allogame e Autogame

L'eterosi è definita come la superiorità fenotipica dell'ibrido rispetto ai genitori, per caratteri come il tasso di crescita, il successo riproduttivo e la resa. Nel richiamare alla mente un'evidente eterosi si pensa generalmente all'incrocio tra due linee pure di mais, o all'incrocio tra razze di cani. Eppure le prime osservazioni di eterosi risalgono a Charles Darwin, che nel suo libro del 1876 descrisse come le piante di *Linnaria vulgaris* derivanti da impollinazione incrociata fossero più vigorose di piante da autoimpollinazione. Darwin studiò sistematicamente il fenomeno in ben 60 specie di vegetali, e arrivò a concludere che l'effetto dell'autoimpollinazione era generalmente deleterio (anticipando ciò che successivamente venne chiamata depressione da *inbreeding*, cioè la riduzione del vigore come conseguenza dell'omozigosi, fenomeno evidente prevalentemente nelle piante allogame), mentre l'impollinazione incrociata risultava favorevole al vigore delle progenie. Il problema della base genetica dell'eterosi è stato dibattuto per oltre un secolo, senza raggiungere un punto fermo, ed è anzi stato accantonato per decenni dopo i fervori iniziali fino ai giorni nostri quando è stato ripreso perché la disponibilità

di strumenti genomici sta aggiungendo tessere importanti al complesso *puzzle*. Diverse ipotesi tra cui dominanza, sovradominanza e pseudo-sovradominanza sono a disposizione per spiegare il fenomeno del vigore ibrido. Secondo il modello della dominanza, proposto da Jones nel 1925, i genitori *inbred* contengono alleli inferiori o deleteri a diversi *loci* che impediscono nel complesso buone prestazioni per importanti caratteri quantitativi, mentre nell'ibrido questi alleli inferiori di un genitore sono affiancati da alleli dominanti e superiori dell'altro genitore. Secondo il modello della dominanza si verificherebbe nell'ibrido una complementazione genetica degli alleli recessivi o deleteri dai rispettivi genitori.

Il limite dell'ipotesi sta nelle sue stesse premesse. In teoria, il genitore che contiene alleli dominanti, o superiori, omozigoti a tutti i *loci* dovrebbe superare gli ibridi, ma la lunga storia della genetica del mais ci ha indicato diversamente. Lo stesso Shull nel 1948 elaborò il modello della sovradominanza, secondo il quale le nuove interazioni alleliche eterozigoti per ciascuno dei molti *loci* genetici portano a funzioni superiori alle condizioni omozigoti presenti nei genitori *inbred*. L'effetto positivo (stimolo fisiologico allo sviluppo) dell'incrocio tra due linee pure geneticamente lontane è tanto maggiore quanto più diversi erano i parentali coinvolti nella fecondazione (Fig. 10). Questo modello spiega perché gli ibridi (F1) superino sempre i genitori *inbred*, che sono stati comunque selezionati e quindi contengono molti *loci* genetici superiori o dominanti in fase omozigote. Inoltre, è la combinazione allelica negli ibridi che determina i livelli di eterosi: la composizione genetica dei genitori *inbred* non è necessariamente predittiva dei livelli di vigore ibrido. Uno studio più recente suggerì un modello alternativo, la pseudo-sovradominanza. La pseudo-sovradominanza è associata alla complementazione di due o più alleli dominanti e recessivi legati in *repulsion* (in *trans*), in cui gli alleli dominanti e recessivi si trovano in omologhi opposti, agendo nell'ibrido, dove vengono riuniti, come in una sorta di sovradominanza dovuta al linkage (Barcaccia *et al.*, 2006).

Nell'era genomica tutti i modelli di eterosi sono stati ritrovati in diversi riscontri sperimentali, ma nessuno di essi è ritenuto sufficiente a spiegare tutte le osservazioni. Per esempio, è stata documentata una sorta di complementazione nell'ibrido di geni assenti alternativamente in una delle due *inbred* di mais. L'ipotesi di una complementazione molecolare dovuta a geni in emizigosi nelle *inbred*, limitata alla scoperta in mais, potrebbe essere verificata nei prossimi anni grazie ai grandi progetti di risequenziamento di diversi genotipi. Differenze di espressione su scala genomica sono state individuate nell'ibrido rispetto ai

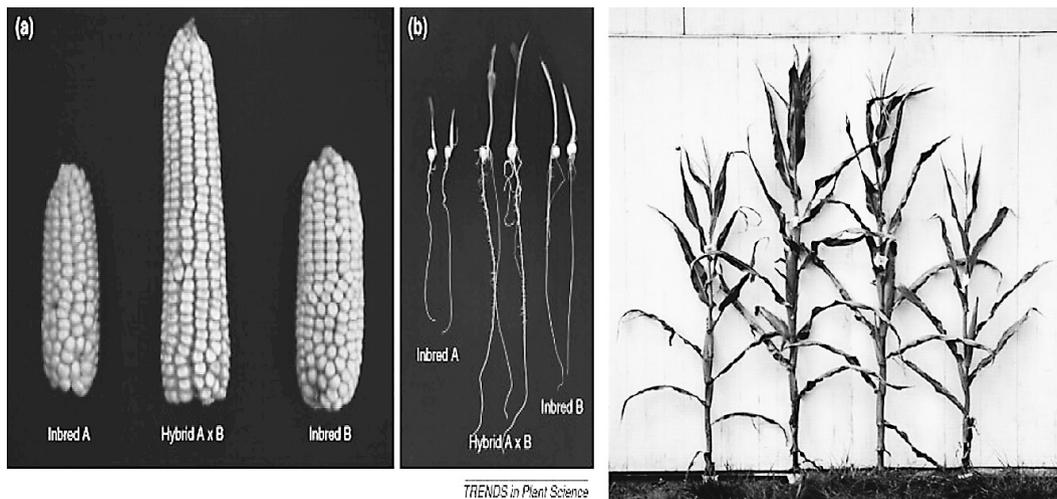


Fig. 10. Manifestazione dell'Eterosi nella spiga, radichette e pianta intera di mais: confronto tra la F1 e i due parentali inbred.

genitori *inbred*. Molti geni sono cioè differenzialmente espressi nell'ibrido rispetto alla *inbred*. Tali differenze di espressione, scoperte in diverse specie e con diverse metodologie genomiche, sono legate all'“orologio” molecolare circadiano interno alle piante. L'“orologio” (i ritmi circadiani) capta segnali di luce e temperatura e li integra in vie molecolari che determinano una crescita e adattamento superiori nelle piante F1 rispetto ai parentali.

Sulla base di molte e diverse osservazioni, provenienti anche dal regno animale, una recente ipotesi molecolare prevede che un meccanismo cellulare di controllo qualità individui e reprima nell'ibrido l'espressione di alleli che codificano per proteine instabili. La repressione degli alleli dettata da questa semplice regola darebbe agli ibridi un vantaggio di accrescimento dovuto a una maggiore conservazione dell'energia e a un maggiore ritmo di divisione cellulare. Ciò spiegherebbe sia una componente di dominanza sia di sovradominanza, quando la stabilità delle proteine derivate dai due alleli fosse diversa in funzione dell'ambiente, quindi fornendo una più ampia adattabilità ambientale all'ibrido. Inoltre essa sarebbe anche compatibile con le osservazioni di depressione da inbreeding e di accresciuta eterosi nell'alloploiploide, dove la scelta degli alleli in funzione della stabilità proteica sarebbe ancora più ampia.

L'eterosi si è dimostrata strategia di grande interesse applicativo non solo nelle Allogame (nel mais si sono raggiunte 17 t/ha in pieno campo), ma anche nelle piante autogame. Particolarmente rilevante è l'esempio del pomodoro (specie autogama), in cui lo sfruttamento di questo fenomeno ha spostato le produzioni, negli ultimi 50 anni, dagli iniziali 300

q/ha agli attuali 1200 q/ha in pieno campo e 2200 q/ha in serra. L'interesse verso lo sfruttamento dell'eterosi si è spostato anche su specie cleistogame come frumento e orzo. In un secolo di applicazioni scientifiche nelle piante coltivate si sono raggiunti risultati straordinari. Agli esempi sopra riportati si può aggiungere la barbabietola da zucchero, che è passata negli ultimi 40 anni da una produzione media di radici di 30 t/ha ad oltre 100t/ha con un indice zuccherino del 15%.

Abbiamo raggiunto il plateau?

Feeding Ten Billion: con i risultati fin qui raggiunti si può pensare di alimentare il pianeta nei prossimi 40 anni, quando la specie umana supererà i 9 miliardi di individui?

La scienza e la tecnologia hanno fornito in questi ultimi decenni risultati straordinari: un esempio significativo è rappresentato dai cereali con una produzione mondiale di granella passata da 600.000 tonnellate nel 1950 a 2.5 miliardi di tonnellate nel 2015.

In considerazione del fatto che non possiamo più applicare la regola della messa a coltura di nuove terre, ma che dobbiamo risparmiare il terreno dalle continue razzie antropiche, nasce l'imperativo di dover chiedere all'unità di superficie l'ulteriore sforzo di ospitare, in perfetto equilibrio, nuove piante capaci di garantire il cibo per 10 miliardi di persone. Alla domanda se ciò sia possibile, la risposta è stata positiva, ma dobbiamo disegnare nuove strategie.

La genetica ha visto crescere intorno a sé diverse discipline che hanno contribuito ad approfondire le conoscenze sulla ereditarietà dei caratteri, ma è con

l'avvento della genomica che si comincia ad avere una visione molto più ampia e precisa della struttura e funzione di singoli geni, dei genomi, e di come questi possano essere assemblati in genotipi superiori.

Gli obiettivi attuali sono rivolti a convogliare gli sforzi delle diverse discipline scientifiche verso lo sviluppo di tecnologie mature per l'agricoltura del futuro, a garanzia di produzione di alimenti per tutti.

Se si analizza lo sviluppo e la crescita di una pianta addomesticata, si evidenzia che anche nelle migliori condizioni ambientali non si è riusciti a ridurre in modo consistente il *gap* esistente tra la produzione potenziale e quella effettiva raggiunta in azienda. Questo è il primo problema da affrontare.

Il secondo è quello di disegnare nei prossimi anni un nuovo modello di pianta capace di innalzare ulteriormente la potenzialità produttiva. Se consideriamo il frumento, risulta evidente che le nuove varietà e le nuove tecniche agronomiche, in alcuni Paesi Europei, hanno permesso di raggiungere una media nazionale superiore a 8 t/ha con una potenzialità di 12-14 t/ha, cioè sono stati ottenuti circa 20.000 semi/m² di terreno senza intensificare l'uso di prodotti di sintesi (Fig. 11). Oggi si può dire che teoricamente è possibile raggiungere 30.000 semi/m² e superare la barriera delle 15 t/ha. Tuttavia, come noto, eventi sfavorevoli durante il ciclo biologico riducono drasticamente lo sviluppo, la crescita, la fertilità, l'allegagione dei fiori e la dimensione dei frutti.

La sfida è di ottenere una nuova pianta capace di far fronte alle cause avverse durante tutto il ciclo biologico. Oggi conosciamo in modo approfondito la tappa metabolica di risposta all'insulto; disponiamo della sequenza del genoma di molte specie; presso le banche del germoplasma sono disponibili i passapor-

ti delle singole varietà con la descrizione fenotipico-molecolare delle loro caratteristiche peculiari; sono state disegnate nuove architetture di piante arboree (ad es. il portamento colonnare del melo (Wolters *et al.*, 2013); con l'aiuto della genomica nuove strategie di *breeding* sono state messe in opera per incorporare più geni in un genotipo superiore (*Pyramiding*, *GAS*, *GWAS*) e nuove tecniche agronomiche saranno via via disponibili per appiattare sempre più la curva degli *input* di sintesi.

Come già detto, tutti questi sforzi dovranno seguire un percorso di compatibilità ambientale. Per alcuni aspetti della destinazione d'uso della biomassa, si comincia a sperimentare la coltivazione di piante perennanti al fine di ridurre gli input tecnologici (Fig. 12).

Nuovamente, alla domanda se la scienza e la tecno-

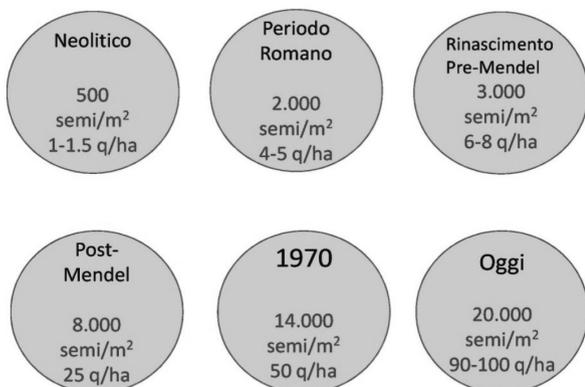


Fig. 11. Incremento del numero di semi/m² e produttività dell'orzo a partire dal Neolitico, con *Hordeum spontaneum*, e dal periodo Romano ad oggi con *H. vulgare*.



Fig. 12. *Hordeum bulbosum*: pianta perennante mediante riproduzione agamica per bulbilli (sinistra) e sessuata (allogama) per seme. A destra sono evidenti le antere dopo antesi. Ha colonizzato un ampio habitat dall'Uzbekistan al Bacino del Mediterraneo sino al Salento e cresce tra i muri a secco e negli incolti- Pianta raccolta in una popolazione a Soletto (LE).

logia abbiano gli strumenti per produrre alimenti per 10 miliardi di individui nei prossimi 40 anni, la risposta non può essere che positiva, – tenendo in mente di ridurre gli sprechi – perché abbiamo già oggi, rispetto a qualche decennio fa, strumenti di conoscenza assolutamente nuovi: la base di tutto risiede nella conoscenza del genoma delle piante.

L'analisi dei genomi è stata la maggiore conquista della genetica moderna per lo studio della struttura e funzione dei singoli geni e dell'intero genoma degli esseri viventi, fondamentale anche per comprenderne le dinamiche evolutive e sviluppare ulteriori biotecnologie al fine di migliorare specie vegetali per caratteri utili. Sono oggi disponibili le sequenze genomiche ad alta qualità di specie modello quali *Arabidopsis* e *Brachypodium*, oltre a quelle di specie di elevato interesse

agronomico quali riso, mais, vite, melo, pioppo, caffè, patata, pomodoro, carciofo, orzo, frumento tenero e *dicoccoides*. I genomi del riso e del *Brachypodium* sono particolarmente importanti perché servono anche da modello per lo studio dei genomi degli altri cereali, appartenenti alla famiglia delle *Poaceae*. I ricercatori italiani hanno contribuito in maniera determinante all'ottenimento di questi risultati.

Tra i genomi di maggiore complessità si annovera quello del frumento tenero (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42\text{-AABBDD}$) (Tab. 2), stimato in 17 miliardi di bp, pari a cinque volte il genoma umano e a circa quaranta volte quello del riso. È caratterizzato dalla presenza di elementi ripetuti per circa l'80%. Si stima che soltanto nel cromosoma 5A siano contenuti da cinque a seimila geni. (Vitulo *et al.*, 2011).

Tab. 2. Dimensione dei Genomi di alcune specie vegetali e di un fungo micotossigenico (*Fusarium*).

Specie	Dimensione Genoma (milioni di bp)*	Numero di geni	Rivista	Anno
Arabidopsis	125	26.500	Nature	2000
Mais	2.000	32.000	Science	2009
Riso	430	37.544	Science	2002
Vite	475	30.434	Nature	2007
Pomodoro	900	35.000	Nature	2012
Patata	844	39.031	Nature	2011
Frumento tenero	17.000	124.000	Science	2014
Frumento dicoccoides	10.500	67.185	Science	2017
Orzo	5.000 ^{ww}	39.734	Nature	2017
Arancio	300	25.000	Nature Bioth.	2014
Pesco	265	27.852	Nature Gen.	2013
Melo	742	57.386	Nature Gen.	2010
Quinoa	1.450-1.500	33.365	Nature	2016
<i>Fusarium langsethiae</i>	37.5	12.232	I.J. Food. Microbiol.	2016
Pioppo	520	41.000	Science	2006
Melanzana	833	38.498	DNA Research	2014
Melone	450	27.427	PNAS	2012
<i>Brachypodium</i>	220	36.477	Nature	2010
Soia	1.100	46.430	Nature	2010
Carciofo	1.084	38.726	Nature	2016
Barbabietola	714-758	27.421	Nature	2013
Asparago	1.300	27.334	Nature comm.	2017

* Paia di basi.

La storia evolutiva del frumento, pianta poliploide, è affascinante perché per la sua nascita c'è stata la partecipazione di tre differenti specie.

Il primo importante incrocio avvenne tra la specie portatrice del genoma A (*Triticum urartu* AA) e quella portatrice del genoma B (*Aegilops speltoides* BB), incrocio che diede origine a *Triticum turgidum* (AABB), da cui derivò il grano duro tetraploide che utilizziamo per fare la pasta; successivamente, questa specie, attraverso incroci spontanei, unì il proprio genoma con quello di *Aegilops tauschii* (DD) dando origine al frumento tenero *Triticum aestivum* (AABBDD) destinato alla panificazione. Le analisi suggeriscono una datazione più antica rispetto a quanto ritenuto finora (approssimativamente 600-800.000 anni fa per il primo evento di poliploidizzazione e 230-430.000 anni fa per il secondo evento) (Marcussen *et al.*, 2014). Sequenziare il genoma del frumento è stato un po' come completare un puzzle di migliaia di pezzi, tutti molto simili tra loro. Infine, c'è un ultimo aspetto critico da tenere in considerazione: *Triticum aestivum* è infatti un organismo esaploide, essendo composto da tre sottogenomi, a loro volta formati da sette coppie di cromosomi. Riuscire a leggere un genoma complesso come quello del frumento è stato sicuramente un grande risultato, ma si tratta solo del primo passo. Per dare un significato a quelle A, C, G e T – adenina, citosina, guanina e timina, le quattro basi azotate che costituiscono i mattoni fondamentali del DNA – occorre un lungo lavoro di interpretazione dei dati, occorre cioè annotare la sequenza genomica. Per prima cosa si può ad esempio valutare la percentuale di sequenze ripetute, che nel caso del frumento sfiora l'80%. Un dato di non immediata utilità forse, ma che potrebbe essere

comunque interessante dal punto di vista evolutivo. Ma quando si annota un nuovo genoma, gran parte del lavoro è dedicato alla ricerca dei geni che codificano per proteine. Sono questi gli attori principali all'interno delle cellule: dal loro funzionamento dipende il modo in cui la pianta cresce, si riproduce, utilizza i nutrienti e si difende dalle minacce esterne. Considerando la qualità dell'assemblaggio, i ricercatori stimano che *Triticum aestivum* possieda qualcosa come 106.000 geni codificanti per proteine, un numero elevatissimo se rapportato ai 25.000 geni umani, ma perfettamente in linea con le dimensioni considerevoli di questo genoma (Fig. 13). Ciò che rende davvero speciale il genoma di *Triticum aestivum* è il fatto che esso sia in realtà costituito da tre distinti genomi, costretti dall'evoluzione a convivere all'interno della stessa specie. Cosa è accaduto ai tre genomi dal momento in cui si sono incontrati? Hanno mantenuto la stessa sequenza, hanno conservato le stesse funzioni oppure uno di essi ha preso il sopravvento sugli altri due? Nel genoma del frumento si trovano moltissime tracce di questi esperimenti evolutivi: si contano infatti migliaia di geni che mostrano differenze rispetto alla versione originale presente nelle piante selvatiche. Generalmente si tratta di mutazioni senza effetti particolari, ma in alcuni casi l'impatto sulla funzionalità della proteina è stato rilevante. Da queste sequenze ridondanti potrebbero ad esempio originarsi i microRNA (di 20-24 nucleotidi), una categoria di molecole fondamentali per la resistenza agli *stress* ambientali e agli agenti patogeni. Nelle piante, questi sono particolarmente attivi durante lo sviluppo, ma non mancano esempi di microRNA che controllano la risposta agli *stress* ambientali, quali la siccità o la

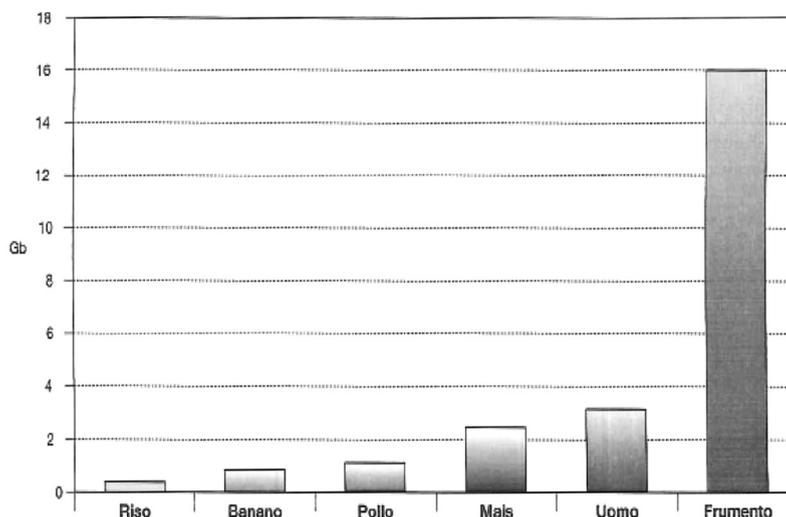


Fig. 13. Comparazione della dimensione di diversi genomi (Gb: gigabasi, miliardi di paia di basi nucleotidiche).

carezza di nutrienti nel terreno, e all'attacco di agenti patogeni. Agiscono spegnendo altri geni in modo mirato, controllando in questo modo la sintesi di nuove proteine. Ogni microRNA colpisce un particolare *set* di geni bersaglio, e gli effetti di questa regolazione possono amplificarsi notevolmente, perché spesso i geni *target* sono fattori di trascrizione, molecole che a loro volta controllano l'espressione di altri geni. Complessivamente, questi risultati suggeriscono che il frumento possiede un enorme "serbatoio" di microRNA al momento poco utilizzato, che potrebbe però essere attivato a seconda delle necessità. Un ulteriore dato molto interessante emerso dall'analisi ha a che fare con l'evoluzione di questo raffinato sistema di regolazione. I microRNA identificati (270) si trovano in zone del genoma caratterizzate dalla presenza di elementi trasponibili (o trasposoni), sequenze ripetute capaci di spostarsi o duplicarsi sul genoma, e molti di questi trasposoni sono gli stessi che si ritrovano anche in corrispondenza dei rispettivi geni *target*. Questi dati sembrano dare supporto a una teoria secondo la quale sono proprio i trasposoni che, spostandosi sul genoma, danno origine sia ai potenziali microRNA sia ai siti di riconoscimento sui geni bersaglio. (Mayer *et al.*, 2014; Avni *et al.*, 2017).

Altri genomi vegetali il cui sequenziamento è stato già completato comprendono il caffè, la *Medicago truncatula*, la fragola, l'arancio, nonché specie cosiddette orfane, di minore rilevanza economica rispetto alle grandi colture, ma comunque con utili destinazioni d'uso, ad es. la quinoa.

Tra le piante da frutto più diffuse, è noto il genoma del melo (*Malus domestica*) varietà *Golden Delicious*, tra le più diffuse al mondo. I 17 cromosomi ($2n = 34$) contengono 742 milioni di basi e oltre 57.000 geni, tra cui spiccano i fattori di trascrizione (oltre 4.000), e i geni correlabili alle resistenze ai patogeni (circa 1.000), oltre quelli che regolano il portamento colonnare della pianta. Sono inoltre rappresentati in numero estremamente elevato i geni MADS coinvolti nello sviluppo del frutto, e i geni del metabolismo basale del pomo, quali ad esempio quelli legati alla sintesi del sorbitolo o glucitolo, lo zucchero tipico delle *Rosaceae*.

Parallelamente si sta procedendo al sequenziamento del genoma di diversi funghi fitopatogeni, la cui analisi apre la possibilità di meglio comprendere quali siano i meccanismi evolutivi che determinano la patogenicità (Lisoe *et al.*, 2016).

Il genoma della vite (*Vitis vinifera*), varietà *Pinot Noir*, è formato da 475 milioni di basi, tre volte più grande di quello di *Arabidopsis* e sei volte più piccolo di quello dell'uomo, e contiene 30.434 geni codificanti per proteine. Una peculiarità di questo genoma è

rappresentata dalla presenza di famiglie di geni legati alle caratteristiche organolettiche del vino.

L'analisi comparativa delle sequenze genomiche ha consentito di delineare i processi evolutivi dei genomi in senso più ampio, non legato a singoli geni, ma all'intero corredo genetico. I genomi vegetali cambiano più rapidamente di quanto non facciano i genomi animali, portando così a una maggior variazione tra specie anche strettamente correlate e anche all'interno di una stessa specie. Il motivo di questa estrema plasticità è da ricercarsi nelle diverse condizioni di vita e di strategie di sopravvivenza delle piante rispetto agli animali, che sembrano dunque richiedere per le prime la presenza di genomi più "flessibili".

Un'importante caratteristica delle piante è che vaste porzioni dei loro genomi sembrano essersi duplicate, ossia interi segmenti di cromosomi con tratti di sequenze geniche quasi identiche si ritrovano in molteplici posizioni del genoma. Ciò suggerisce che, a un certo punto dell'evoluzione, questi genomi siano andati incontro a duplicazione (interamente o in parte) e che in seguito le sequenze duplicate (e quindi ovviamente sia geni che regioni regolative) siano andate in parte perdute e in parte si siano diversificate. I processi di duplicazione genomica implicano dunque molto più che la semplice fusione di due genomi, determinando un intero spettro di regolazioni molecolari e fisiologiche. Il raddoppiamento del genoma altera infatti in modo significativo anche l'espressione dei geni, che possono poi essere espressi a livelli uguali o ineguali o subire processi di silenziamento di una copia (principalmente mediato da meccanismi epigenetici). Sebbene gli studi classici, basati sul conteggio cromosomico, avessero stimato in 30-50% la frazione di angiosperme poliploidi, in realtà gli attuali avanzamenti della genomica suggeriscono come praticamente tutte le angiosperme siano evolutivamente derivate da fenomeni di duplicazione del genoma. Ci sono forti evidenze infatti che indicano come la duplicazione del genoma abbia importanti conseguenze morfologiche, ecologiche e fisiologiche, con effetti sui processi fotosintetici della pianta, sul suo sistema riproduttivo, sulla sua interazione con gli erbivori e gli impollinatori, sulla speciazione.

Durante l'evoluzione, la formazione di poliploidi ha giocato probabilmente un ruolo di primo piano nella diversificazione delle angiosperme ed è stata molto rilevante anche nella genesi di importanti piante coltivate, quali il frumento, brassicacee e alcune rosacee.

Il sequenziamento del genoma della vite ha suggerito come questa pianta, considerata diploide dalla genetica classica, sia in realtà derivata dalla fusione di tre genomi. Questo arrangiamento ancestrale è condiviso da molte altre dicotiledoni e assente in riso, che

è una monocotiledone. La conclusione è, quindi, che questa triplicazione non fosse presente nell'antenato comune alle mono- e dicotiledoni.

Il sequenziamento del genoma del pomodoro coltivato e del suo antenato selvatico, *Solanum pimpinellifolium*, ha evidenziato il fenomeno della poliploidizzazione. Come noto, il pomodoro appartiene alla famiglia delle *Solanaceae*, che comprende sia piante agrarie, quali patata e melanzana, che piante ornamentali e medicinali, quali la petunia, il tabacco, la belladonna e la mandragola. Una peculiarità delle *Solanaceae* è la loro diffusione in ecosistemi molto differenziati. La sequenza del genoma ha fatto nuova luce sulle basi molecolari di questo adattamento. Si è infatti dimostrato che il genoma di pomodoro si è "triplicato" improvvisamente circa 60 milioni di anni fa, in un momento vicino alla grande estinzione di massa che ha portato alla scomparsa dei dinosauri. Successivamente, la maggior parte dei geni triplicati sono stati persi, mentre alcuni di quelli superstiti si sono specializzati e oggi controllano caratteristiche importanti della pianta, comprese quelle della bacca, come il tempo di maturazione, la consistenza e la pigmentazione rossa e nera nonché il profilo organolettico (D'Esposito *et al.*, 2017). Anche nelle orchidee si è avuta una duplicazione genomica e recentemente sono stati individuati geni che controllano processi

dello sviluppo (Zhang *et al.*, 2017). Lo sviluppo della genomica delle piante coltivate sta cambiando profondamente le strategie di ricerca nell'ambito della genetica vegetale e avrà un forte influenza sull'agricoltura moderna. L'avvento dei marcatori molecolari ha consentito di definire la base genetica dei caratteri qualitativi e quantitativi (QTL), di stabilire le relazioni di sintenia tra i genomi (quota del genoma condiviso tra specie vicine o lontane), di verificare i meccanismi genetici che controllano l'eterosi in specie quali il mais. La selezione assistita con marcatori molecolari (*Molecular Assisted Selection - MAS*) per caratteri qualitativi è una realtà ormai diffusa anche presso le grandi ditte sementiere private (Fig. 14). Lo sviluppo di una nuova classe di marcatori molecolari (*Single Nucleotide Polymorphism SNP*) consentirà di automatizzare ed estendere più di quanto sia stato fatto finora le applicazioni basate sui marcatori molecolari, ad esempio sviluppando approcci di *Whole Genome Association Mapping*.

Genoma e adattamento all'ambiente

Il cambiamento del clima e le sue conseguenze stanno emergendo come una delle principali sfide con cui il genere umano dovrà confrontarsi nel prossimo

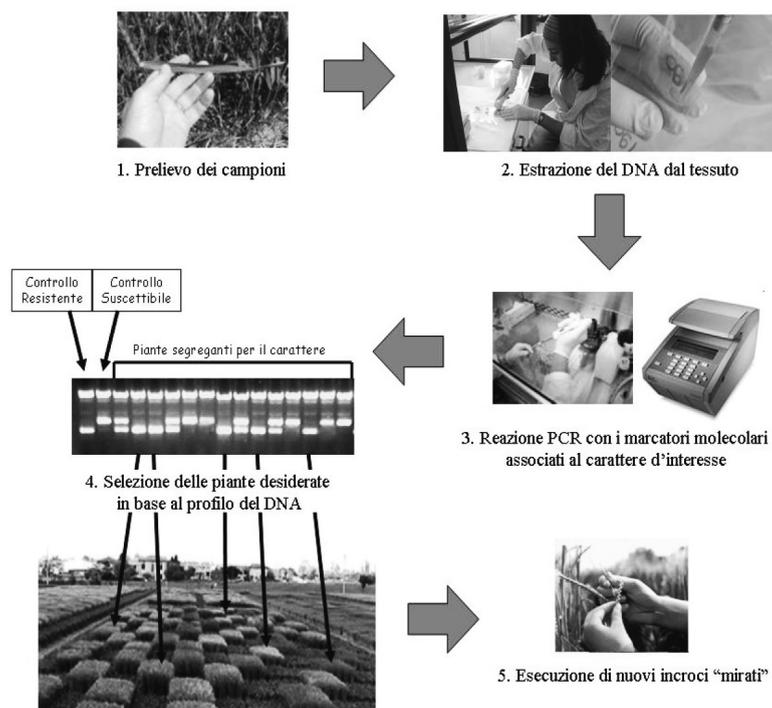


Fig. 14. Piattaforma per la selezione assistita con marcatori molecolari (MAS, Molecular Assisted Selection). *Cortesia di E. Francia e V. Terzi.*

futuro, un argomento ormai al centro del dibattito internazionale, sia in sede politica che scientifica. Variazioni anomale delle temperature e delle precipitazioni e la sempre maggiore frequenza ed intensità di siccità da una parte e di inondazioni dall'altra, avranno implicazioni di lungo periodo sulla capacità produttiva, se non sull'esistenza stessa, degli agro-ecosistemi del pianeta (www.fao.org/climate-change/). L'agricoltura è infatti il settore che più risente di questi cambiamenti, e sarà sempre più vulnerabile in futuro, specialmente in settori marginali di agricoltura di sussistenza, delle regioni semiaride e sub-umide. Pertanto, l'incremento delle produzioni agricole insieme alla stabilità di produzione e la qualità dei prodotti rappresentano l'obiettivo cruciale per l'economia e la sicurezza alimentare di tutti i Paesi.

Nel complesso, le riduzioni quali-quantitative delle produzioni causate da avverse condizioni dell'ambiente colturale sono ingenti, tanto che si stima che soltanto il 10% della superficie coltivata nel mondo può essere classificata nella categoria 'non stress' (crescita in condizioni ambientali ottimali), mentre il restante 90% può essere soggetta a *stress* singoli o combinazione di *stress*, con diversa intensità, che limitano l'estrinsecazione del potenziale genetico della pianta (Guerra *et al.*, 2009). Gli *stress* vengono distinti in biotici (determinati da organismi viventi in grado di infettare o competere con la pianta) e abiotici (dovuti a fattori chimici e fisici). Fra questi ultimi si collocano gli *stress* da alta o bassa temperatura, da carenza o eccesso di acqua, da radiazioni (infrarosse, IR; visibili, VIS; ultraviolette, UV; ionizzanti), da sali (principalmente sodio), da carenze o eccesso di nutrienti, da inquinanti organici e fitofarmaci, da metalli pesanti, da vento e da luce (alta o bassa intensità, fotoperiodo non corretto). I danni arrecati dall'agente stressante alla pianta possono essere diretti o indiretti, primari o secondari. Ad esempio, un danno diretto primario è quello subito da una pianta sottoposta ad un rapido congelamento che provoca in pochissimo tempo la formazione di cristalli di ghiaccio nelle cellule e la loro morte. Allo stesso modo le elevate temperature portano per sé danno alla pianta (*stress* primario) ma, potendo causare collateralmente carenza idrica, possono indurre ulteriori danni (*stress* secondario).

Come può una pianta adattarsi a condizioni ambientali avverse? A livello di 'crop' l'adattamento o *hardening* è stato interpretato come la capacità di raggiungere elevati livelli di produzione anche in situazioni sfavorevoli. Selezionando per elevate produzioni, i *breeders* hanno indirettamente incrementato anche il rendimento in condizioni limitanti, per cui le varietà moderne, dotate di elevata potenzialità produttiva, spesso si comportano meglio rispetto a varietà

antiche o accessioni locali direttamente selezionate in tali ambienti (Rizza *et al.*, 2004).

A livello fisiologico, la resistenza di una pianta allo *stress* viene invece intesa come la sua capacità di sopravvivere, crescere e generare progenie in presenza del fattore sfavorevole (Levitt, 1980). Essa può essere ottenuta mediante tre differenti strategie così definite:

- **EVITARE L'AVVERSITÀ.** In realtà si è di fronte ad una forma di falsa resistenza: la pianta ha un ciclo di sviluppo che la porta a non intercettare l'avversità o ad intercettarla in fasi fenologiche non a rischio. È questo il caso delle varietà precoci di frumento duro e di orzo che sfuggono la stretta da caldo nell'Italia meridionale.
- **EVITARE LO STRESS.** Caratteristica di quelle piante che possiedono barriere stabili morfologiche e/o funzionali che consentono di prevenire o ridurre lo *stress* prodotto dall'avversità. Ad esempio, in caso di *stress* anossico, alcuni meccanismi consentono il trasferimento dell'ossigeno dalle parti ben aerate della pianta verso quelle che ne hanno a disposizione in quantità sub-ottimale (Perata e Alpi, 1993).
- **TOLLERARE LO STRESS.** Le piante sono in grado di attivare meccanismi fisiologici/molecolari in grado di alleviare gli effetti dovuti allo *stress* e/o riparare i danni subiti. Dato l'elevato numero di caratteri fisiologici implicati nella tolleranza, è probabile che non esista un unico *pattern* di risposta ma, al contrario, specie diverse possono raggiungere simili livelli di tolleranza utilizzando differenti meccanismi.

A livello cellulare, infatti, le piante hanno un complesso sistema di percezione e risposta agli *stress* che può essere schematizzato in quattro fasi distinte (Fig. 15):

- **PERCEZIONE DEL SEGNALE.** Il fatto che le piante attivino una serie di processi molecolari in risposta alle variazioni ambientali implica necessariamente l'esistenza di recettori, situati sulla membrana plasmatica delle cellule, che agiscono da sensori rilevando tali cambiamenti. Alcuni studi suggeriscono, ad esempio, un ruolo centrale della fluidità delle membrane nella percezione di alte e basse temperature.
- **ATTIVAZIONE DI MESSAGGERI SECONDARI PER LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE.** Ormoni come l'acido abscissico (ABA), ioni come Ca^{2+} , proteine MAPK (*Mitogen-activated protein Kinase*) e altre molecole partecipano ad una serie di eventi che, come una vera e propria cascata, trasportano il segnale di *stress* fino al nucleo, dove viene attivata la trascrizione di geni di risposta.

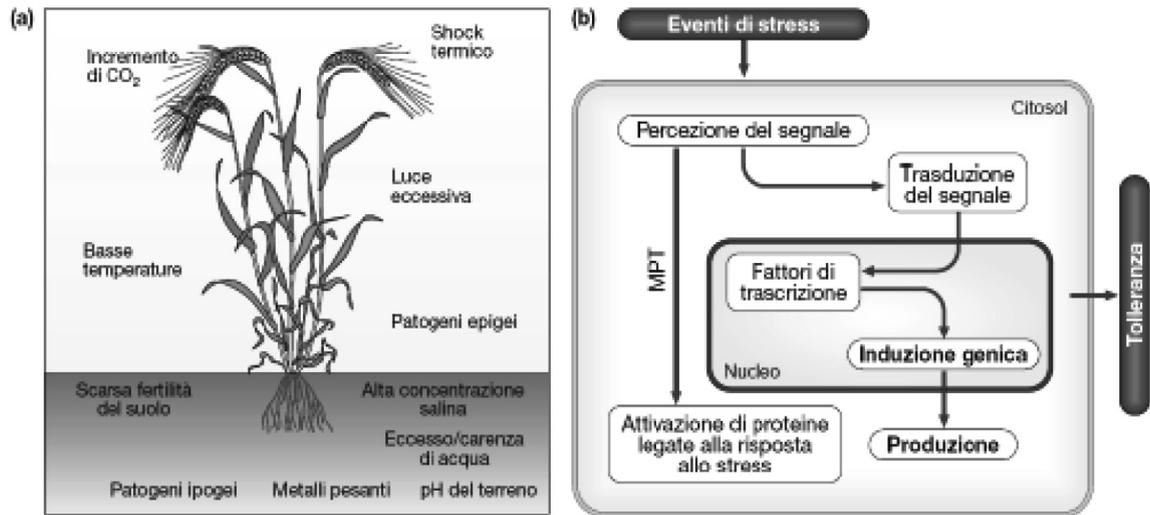


Fig. 15. (a) Eventi di stress con effetti negativi sulla parte ipogea ed epigea della pianta. (b) Risposte cellulari agli stress e attivazione di meccanismi di tolleranza. (MPT = meccanismi post-traduzionali)

- **ATTIVAZIONE DI PROTEINE REGOLATRICI DELLA TRASCRIZIONE.** I fattori trascrizionali, piccole proteine in grado di legare il DNA in regioni specifiche dei promotori e di regolare la trascrizione di molti geni, rappresentano l'ultimo anello della catena di trasduzione del segnale: essi inducono l'espressione dei geni effettori della risposta allo *stress*. A questo livello la regolazione si fa più fine, cosicché per ogni condizione ambientale affrontata sarà possibile avere una risposta specifica e adeguata. L'analisi funzionale di questi fattori di trascrizione dovrebbe chiarire la complessa rete di regolazione dell'espressione di molti geni, responsabile dell'adattamento delle piante all'ambiente.
- **ESPRESSIONE DI PROTEINE LEGATE ALLA RISPOSTA.** Differenti tipologie di proteine possono essere sintetizzate, a seconda del tipo di *stress* cui la pianta è sottoposta. In risposta a condizioni di siccità, basse temperature o alte concentrazioni saline, fenomeni riconducibili alla disidratazione cellulare, si ha ad esempio l'espressione di geni che consentono l'accumulo di osmoliti quali prolina, poliammine, glicina betaina, zuccheri e di ioni come il potassio o il sodio, tutti utili per contrastare la perdita di acqua.

Lo studio della tolleranza agli *stress* abiotici e biotici e la conoscenza dei processi fisiologici e molecolari responsabili della risposta della pianta a tali *stress*, rappresenta una premessa fondamentale per lo sviluppo di nuovi genotipi altamente produttivi anche in condizioni limitanti.

Studi volti all'analisi dell'espressione genica in condizioni di *stress* e basati su svariate tecnologie di *screening* hanno permesso l'isolamento di numerosi *stress-related genes*, e permettono di avere un quadro preliminare, ma al contempo globale, dei geni coinvolti nei processi metabolici più complessi del ciclo vitale delle piante (sviluppo e crescita, resistenza al freddo, al caldo, alla siccità, alle malattie, maturazione dei frutti, ecc.). Tuttavia l'aspetto fondamentale per la comprensione dei processi molecolari complessi è costituito dall'analisi dei meccanismi di *signal transduction*. L'identificazione dei recettori dei segnali ambientali o ormonali, dei messaggeri secondari, dei fattori di trascrizione coinvolti nei processi cellulari complessi, nonché lo studio delle interazioni di questi elementi tra loro e con l'ambiente rappresenta la chiave per comprendere il funzionamento globale della cellula e quindi la base molecolare del fenotipo. Un ruolo fondamentale in queste ricerche è rappresentato dalla disponibilità di mutanti per caratteri utili.

Negli ultimi anni, studi e ricerche hanno portato all'identificazione e descrizione di un enorme numero di geni coinvolti nei meccanismi di risposta delle piante a *stress* fisici e chimici. L'analisi su larga scala del trascrittoma ha infatti evidenziato che centinaia di geni sono attivati o repressi in risposta agli *stress*. I diversi geni individuati, oltre ad avere un ruolo diretto nella protezione delle cellule dai danni causati da *stress* osmotico, sono coinvolti nell'attivazione di circuiti di regolazione che controllano l'intero *network* della risposta. Tali geni sono, quindi, generalmente divisi in due categorie: geni funzionali, che includono

quelli implicati nella sintesi di molecole e proteine con ruolo protettivo di processi cellulari cruciali (proteine protettive, enzimi detossificanti, osmoliti compatibili ed altri), e geni regolatori, codificanti proteine regolatrici coinvolte nella percezione e trasduzione del segnale di *stress* (putativi recettori, calmoduline, *calcium-binding proteins*, fosfolipasi, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione), che modulano l'espressione dei geni appartenenti alla prima categoria. I fattori di trascrizione sono considerati ottimi *targets* per rendere una pianta tollerante a *stress*.

La vita della pianta, oltre gli *stress* abiotici, viene tormentata da attacchi anche massicci di parassiti vegetali ed animali. Durante la loro crescita le piante sono costantemente attaccate da patogeni che cercano di invaderle. Questi patogeni accedono all'interno dei tessuti vegetali della pianta tramite meccanismi di penetrazione attivi che forzano gli strati esterni e la parete cellulare, attuati da funghi e nematodi, o attraverso aperture naturali (stomi, idatodi, lenticelle) e ferite nel caso dei batteri, o veicolati da insetti e funghi e da operazioni meccaniche che causano ferite. I patogeni possono invadere tutti gli organi della pianta, a partire dal seme in fase di germinazione, fino alle radici, ai fusti, alle foglie e ai frutti. Per rispondere alla presenza di patogeni che cercano di invaderle, le piante non possiedono un sistema immunitario adattativo, come quello presente negli animali, ma hanno a disposizione meccanismi di resistenza basati su un sistema immunitario innato che consente di riconoscere e rispondere all'azione di patogeni specifici. La cosiddetta "immunità" delle piante dipende da eventi dotati di autonomia cellulare: una singola cellula che subisce un tentativo di invasione è in grado di attuare tutti i processi che portano a una risposta di resistenza. Alla base di questa serie cruciale di eventi è stato individuato un repertorio molecolare di riconoscimento molto esteso, ed è proprio grazie a quest'ultimo che gli organismi vegetali sono in grado di sopperire alla già menzionata mancanza di un sistema immunitario adattativo (Baldwin, 2017).

A valle dei fenomeni di riconoscimento le piante infettate possono attivare geni che determinano la sintesi di un'ampia varietà di molecole, tra cui le fitoalessine, piccole molecole ad ampio spettro antimicrobico sintetizzate dalla pianta in tempi brevissimi, e le proteine PR (*pathogenesis related*), a più lenta azione, ma dotate di molteplici funzioni. Queste, e altre molecole ancora, rientrano in meccanismi di notevole complessità, quali la risposta ipersensibile e la resistenza sistemica acquisita. La risposta ipersensibile attiva la produzione massiccia di specie reattive dell'ossigeno, associata all'induzione di fenomeni di morte cellulare programmata, che determinano lesioni necrotiche. Questo fenomeno

di morte programmata di alcune cellule della pianta ha il ruolo fondamentale di contenere e isolare l'invasione microbica. La pianta innesca inoltre la produzione di metaboliti aromatici secondari, sia a livello locale che, attraverso la sintesi e la diffusione di segnali chimici, a livello sistemico. È noto, inoltre, che le piante possono segnalare la presenza di un patogeno attraverso la produzione di composti volatili, in modo da allertare i sistemi di difesa delle foglie/piante vicine. Nella risposta ipersensibile rientrano numerosi altri fenomeni, quali la sintesi di composti fenolici direttamente tossici per il patogeno – come è il caso delle fitoalessine – oppure il rinforzo delle pareti cellulari vegetali attraverso lignificazione e deposizione di callosio. Una forma di immunità a lungo termine è invece la resistenza sistemica acquisita: in presenza di acido acetilsalicilico endogeno – una delle molecole prodotte nella risposta ipersensibile – si attiva una cascata di segnali genici che risultano in una massiccia produzione di proteine PR, che assicurano un incremento generale della resistenza della pianta ai patogeni.

Molti funghi e batteri che infettano le piante producono una grande quantità di enzimi che degradano la parete cellulare come, per esempio, le poligalatturonasi, le pectinmetilesterasi, le endoglucanasi e le xilanasi. Le piante, a loro volta, hanno sviluppato una serie di risposte di difesa tra cui gli inibitori proteici di questi enzimi, come le PGIP (*polygalacturonase-inhibiting protein*), le PMEI (*pectinmethyl esterase inhibitor*), che inibiscono enzimi che degradano la pectina e gli inibitori delle xilanasi, che inibiscono enzimi che degradano le emicellulose. Il coinvolgimento di questi inibitori nella risposta di difesa della pianta è stato dimostrato attraverso la produzione di piante transgeniche sovraesprimenti questi inibitori, sottoposte ad infezione con determinati patogeni (Tundo *et al.*, 2016). Piante transgeniche di frumento sovraesprimenti l'inibitore AcPMEI di kiwi, PvPGIP2 di fagiolo o il TAXI III sono risultate più resistenti al patogeno fungino *Fusarium graminearum* rispetto al controllo *wild type*.

Quanto sin qui descritto indica che è possibile tracciare oggi strategie genetico-molecolari per l'identificazione e l'introggressione dei geni di resistenza nel germoplasma coltivato come un valido strumento per costituire nuove varietà resistenti e conseguentemente limitare le perdite produttive imputabili ai patogeni e l'uso di fitofarmaci in agricoltura, con indubbi vantaggi in termini economici e ambientali. Tuttavia, l'efficacia della resistenza della pianta è sovente limitata nel tempo perché alcuni ceppi patogeni evolvono la capacità di superarla: si tratta di geni resistenza razza-specifica che agiscono in tempo limitato. Da una parte, si sta percorrendo la strada della rincorsa verso la scoperta di nuovi alleli utili nel germoplasma anche

selvatico, e dall'altra dell'introduzione della “*durable resistance*” come fonte di difesa che conferisce resistenza completa verso tutti gli isolati del patogeno. Tutto sarà possibile perchè alle tecniche di genetica “convenzionale”, poco efficienti e costose, per l'ottenimento di una varietà resistente, si è affiancata la tecnologia molecolare basata sulla *Marker Assisted Selection* (MAS), la *GAS Genomic Assisted Selection* e sulla trasformazione genetica. La MAS si basa sul principio che i marcatori molecolari strettamente associati ai geni R eliminano la necessità di complesse analisi fenotipiche per identificare gli individui resistenti anche nelle prime generazioni delle popolazioni segreganti. In più, la MAS permette una più rapida risposta a un crollo della resistenza, una veloce erogazione di geni multipli derivanti da diversi germoplasmi attraverso il “*gene pyramiding*” e la selezione di rari ricombinanti tra geni di resistenza strettamente associati.

Uno degli aspetti di particolare interesse riguarda la genomica per la qualità e sicurezza alimentare. La qualità delle produzioni agroalimentari rappresenta un parametro particolarmente complesso, coinvolgendo le esigenze spesso differenti dei diversi attori delle filiere, quali i produttori, gli stoccatore, i trasformatori ed infine i consumatori. Innumerevoli sono gli esempi di applicazioni biotecnologiche al miglioramento della qualità in piante agrarie, così come ampie sono le prospettive delle biotecnologie applicate alle richieste mutevoli del settore. L'uso di marcatori molecolari associati a caratteri di pregio per il loro trasferimento attraverso la MAS o la *Genomic Assisted Selection* viene praticato ormai routinariamente con l'obiettivo di associare alle elevate produzioni anche le caratteristiche qualitative, incluse le qualità organolettiche di un prodotto.

Sono stati identificati nelle diverse collezioni di germoplasma genotipi portatori di caratteristiche specifiche dell'aroma e di composti funzionali di cui si conosce il sicuro benefico effetto sulla salute umana. Tutto ciò però deve essere dimostrato in qualsiasi tappa della filiera e pertanto il processo necessita di strumenti inequivocabili di tracciabilità. Con il termine tracciabilità molecolare vengono indicate metodiche genomiche, proteomiche e metabolomiche capaci di dare indicazioni su diverse caratteristiche di una produzione agraria o di un prodotto agroalimentare, quali sicurezza e qualità, origine geografica, valore nutrizionale, autenticità. Il *fingerprinting* molecolare è applicabile a tutti i livelli delle filiere di produzione agroalimentare, partendo dalla caratterizzazione della diversità genetica fino ad arrivare alla tracciabilità delle materie prime nelle fasi di trasformazione, confezionamento e distribuzione degli agro derivati. È oggi possibile utilizzare tecniche di *DNA profiling* per

verificare la presenza in un prodotto finito di specie vegetali potenzialmente allergeniche, ma anche verificare la composizione di una pasta alimentare sia in termini di specie cerealicole presenti che in termini di varietà (Terzi *et al.*, 2004). A questo si aggiunga l'importanza di avere a disposizione anche approcci proteomici per la diagnostica di proteine ed enzimi responsabili di caratteristiche desiderabili o, al contrario, indesiderabili.

Grande attenzione è inoltre rivolta alla verifica della qualità microbiologica delle produzioni agroalimentari: tecniche di tracciabilità molecolari sono usate per la valutazione della presenza di microrganismi pericolosi nei diversi passaggi della filiera di produzione, partendo dai possibili contaminanti in campo ed arrivando ai patogeni veicolati dagli alimenti. Una necessità è, ad esempio, il miglioramento delle strategie di controllo, monitoraggio e riduzione della presenza di micotossine. Queste sono molecole prodotte da funghi filamentosi, quali *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Alternaria*, che possono contaminare vari segmenti della filiera produttiva dell'alimento, portando all'accumulo di tricoteceni, aflatossine, ocratossine, fumonisine, etc. ad effetto devastante sulla salute. I problemi connessi alle micotossine vanno dal fatto che queste molecole sono attive nell'alimento anche quando la muffa che le ha prodotte è stata uccisa, fino al rischio di “*carry over*”, con il loro trasferimento all'uomo attraverso i derivati dell'industria zootecnica. Un'efficace strategia di controllo del problema micotossine ha bisogno di sistemi innovativi di identificazione e quantificazione degli agenti contaminanti e in questo senso la tracciabilità molecolare rappresenta una via particolarmente promettente.

Una nuova metodologia di caratterizzazione chimica in fase di affinamento, prevede l'uso di elementi in traccia e marcatori isotopici per identificare zone di produzione di prodotti agricoli e processi di trasformazione.

Nonostante il grande effetto di singoli geni sulla potenzialità produttiva, gran parte delle diversità di produzione tra varietà delle specie coltivate è attribuibile a fattori quantitativi (QTL), spesso caratterizzati da una forte interazione con l'ambiente. La definizione delle basi molecolari dei QTL, particolarmente di quelli che mostrano la maggior stabilità nei vari ambienti, costituisce un aspetto prioritario per poter sviluppare il miglioramento delle capacità produttive attraverso un sistema di MAS.

Alla selezione assistita con marcatori molecolari si affianca la tecnologia della trasformazione genetica. I nuovi indirizzi biotecnologici sono rivolti a produrre piante geneticamente modificate prelevando geni da piante filogeneticamente affini – Piante Cisgeniche –

oppure da piante filogeneticamente lontane – Pianta Transgeniche. I benefici attesi dall'impiego delle PGM in agricoltura sono stati ampiamente discussi in pubblicazioni internazionali e nazionali nonché con interventi sul sito di società scientifiche come la Società Italiana di Genetica Agraria (www.siga.unina.it/gmo'01.html) o la Società Americana di Biologia Vegetale (www.aspb.org/publicaffairs/aspb'statement'on'genetic'modifi.cfm).

Tra i benefici, sono stati segnalati: il minor consumo di pesticidi chimici, l'incremento percentuale di specifici nutrienti, la maggiore produttività e quindi un minor sfruttamento delle risorse naturali, la possibilità di utilizzare le piante come fabbriche naturali di sostanze industriali o farmaceutiche, individuando così nuovi orizzonti per la produzione agricola, la possibilità di cambiare in maniera mirata e più velocemente, rispetto al tradizionale incrocio, pochi caratteri deficitari in una varietà altrimenti buona, la possibilità di eliminare potenziali allergeni nelle colture, la possibilità di monitorare il livello d'inquinamento nel suolo e di ridurlo rimuovendo i composti inquinanti.

Una nuova biotecnologia molecolare è stata recentemente messa a punto nel settore vegetale per introdurre o eliminare in modo preciso sul genoma sequenze codificanti. È stata definita "Editing del Genoma - CRISPR/Cas9" e deriva da un processo di difesa dei batteri verso l'attacco di virus. Si sta utilizzando in modo massiccio in campo umano e nelle piante è stata introdotta nel miglioramento genetico.

La conoscenza dei meccanismi che regolano l'architettura della pianta, molto spesso mediata da un controllo ormonale, sono fondamentali per i nuovi ideotipi di pianta per il futuro. In genere gli studi sono stati rivolti principalmente a fisiologia, metabolismo e genetica della parte aerea delle piante. Oggi tuttavia una maggiore attenzione viene rivolta alle radici, per migliorare l'efficienza d'uso dell'acqua (*Water Use Efficiency*), dell'azoto (*Nitrogen Use Efficiency*), del Fosforo (*Phosphorus Use Efficiency*), alla resistenza al freddo (*Cold Responsive Genes*), alle proprietà fisico-chimiche e biologiche del suolo e al loro impatto sulla resistenza alle malattie, in modo da disegnare un moderno sistema integrato (IPM: *Integrated Pest Management*) per mettere i nuovi genotipi di pianta nella migliore condizione di crescita. Sono in atto in pieno campo i primi esperimenti di simulazione dell'incremento della CO₂ nell'atmosfera (FACE *Free Air Carbon-Dioxide Enrichment*), che si prevede passerà dalle 380 ppm attuali a 600 ppm nel 2050, per verificare l'effetto sulla fotosintesi e qualità dei prodotti (Verrillo *et al.*, 2017).

Sulla base di tutto ciò, è stata "disegnata" una nuova pianta di frumento tenero capace di raggiungere una potenzialità produttiva di 20t/ha nel 2020 parten-

do dalle 14 t/ha del 2008. Non trascurabile è anche il tema che vede il sistema produttivo agrario non più basato sul trinomio Pianta-Atmosfera-Suolo ma piuttosto sul quadrimio Pianta-Atmosfera-Suolo-Microrganismi che vivono intorno o dentro le radici. Questa nuova visione ha stimolato la nascita di *network* per monitorare l'evoluzione del *metagenoma* al variare dei diversi sistemi colturali e degli ambienti, e come questo possa influenzare la vita delle specie agrarie e selvatiche e l'assorbimento degli elementi nutritivi come il fosforo (Castrillo *et al.*, 2017). Si ipotizza già che la *performance* di specie di piante e di genotipi entro specie dipenderà anche dagli inoculi microbici, specifici per l'esaltazione di determinati caratteri, che interagiscono con gli elementi fisico-biochimici del suolo e con il microbioma naturale in specifiche condizioni (Bulgarelli *et al.*, 2015).

Le nuove sfide della moderna genetica, per contribuire ad alimentare l'umanità, si baseranno sempre più sulla ricerca di base e l'Innovazione tecnologica, in particolare quella derivata dalle discipline "omiche", tra cui si sta affermando non solo in campo vegetale ma più intensamente in campo microbico, animale e umano l'Editing del Genoma, e sulla velocità con cui queste nuove tecniche raggiungeranno l'azienda agraria.

Ne consegue che la Scienza applicata all'Agricoltura rappresenta il motore dell'aggiornamento ed è direttamente coinvolta nel disegnare i nuovi orizzonti dell'Agricoltura, dell'Alimentazione e dell'Ambiente, partendo dal presupposto che, come ben noto, sarà necessario raddoppiare la produzione di cibo entro il 2050 senza causare danni all'ambiente, e concorrere con colture specializzate a produrre energia, farmaci, polimeri e altre sostanze importanti per la medicina e l'industria. L'aumento delle produzioni agricole, la stabilità delle produzioni, la qualità dei prodotti e la loro tracciabilità, il rispetto delle regole delle razionali pratiche agricole dettate dall'innovazione tecnologica (che si basa sulla conoscenza=sostenibilità) sono gli imperativi ai quali l'agricoltura moderna deve far fronte per garantire cibo a sufficienza all'uomo e agli animali in allevamento.

In conclusione è necessario ricordare che già attualmente le conoscenze derivate dall'approccio genomico consentiranno di utilizzare meglio le piante come fonte di energia rinnovabile, e di produrre dalle piante farmaci, polimeri e altre sostanze importanti per la medicina e per l'industria. Con le tecniche proprie dell'analisi genomica (uso sempre maggiore di marcatori molecolari, impiego dell'ingegneria genetica, sequenziamento dei geni e genomi, analisi globale dell'espressione genica, analisi del proteoma e delle sue modificazioni, analisi globale dei metaboliti)

è possibile studiare i genomi, intesi come insieme di geni e proteine che interagiscono tra loro, e comprendere i meccanismi che regolano il metabolismo cellulare sino a determinare l'espressione fenotipica che rappresenta, in ultima analisi, il valore agronomico ed alimentare delle piante coltivate. Da tutto ciò consegue che la genetica vegetale, punto focale della strategia della "Systems Biology" rappresenterà la base per garantire cibo a sufficienza e di qualità ai dieci miliardi di esseri umani previsti per il 2050, senza turbare l'equilibrio ambientale.

Riferimenti bibliografici

- Bai Y., Lindhout P. (2007), *Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?*, *Annals of Botany* 100: 1085-1094.
- Baldwin I.T. (2017), *The plant as pugilist*, *Nature* 543 (7643): 39.
- Barcaccia G., Lorenzetti S., Falcinelli M. (2006), *Sull'eterosi nelle piante: dall'ipotesi genetica di Jones all'era genomica - UNIPG-1*.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Munch P.H. et al. (2015), *Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley*, *Cell Host Microbe*; 17: 1-12.
- Butelli E. et al. (2017), *Changes in Anthocyanin production during domestication of Citrus*, *Plant Physiology* 173: 2225-2242.
- Castrillo G., Teixeira P.J.P.L., Herrera Paredes S., Law T.F., de Lorenzo L., Feltcher M.E. et al. (2017), *Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity*, *Nature* 543 (7646): 513-518.
- Cavalli Sforza L. e F. (2005), *Perché la scienza. L'avventura di un ricercatore*, Oscar Saggi Mondadori, p. 393.
- Columella (1977), *L'arte dell'agricoltura*, traduzione di Rosa Calzecchi Onesti Einaudi, pp. XXIII - 1060.
- D'Esposito D., Ferriello F., Dal Molin A., Diretto G., Sacco A., Minio A., Barone A., Di Monaco R., Cavella S., Tardella L., Giuliano G., Delledonne M., Frusciante L., Ercolano M.R. (2017), *Unraveling the complexity of transcriptomic, metabolomic and quality environmental response of tomato fruit*, *BMC Plant Biology* 17:1-18.
- Gonzali S., Mazzuccato A., Perata P. (2009), *Purple as tomato: towards high anthocyanin tomatoes*. *Trends in plant science*, 14: 237-241.
- Guerra D., Tondelli A., Biselli C., Stanca A.M. (2009), *Analisi del genoma delle piante coltivate per l'adattamento all'ambiente culturale*, I Georgofili - Quaderni, VI: 129-148.
- Lisoe E., Terzi V., Orru L., Lamontanara A. et al. (2016), *Draft genome sequence and chemical profiling of Fusarium langsethiae, an emerging producer of type A trichothecenes*, *Int. J. Food Microbiol.* 221: 29-36.
- Marcussen T., Sandve S.R., Heier L., Spannagl M., Pfeifer M., Jakobsen K.S., Wulff B. BH., Steuernagel B., Mayer K. FX., Olsen O.-A., *International Wheat Genome Sequencing Consortium 2014. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat*, *Science* 345, n. 6194, 1250092.
- Mayer K. FX., Rogers J., Doležel J., Pozniak C., Eversole K., Feuillet C., Gill B., Colaiacovo M., Faccioli P., Stanca A.M., Cattivelli et al. (2014), *A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) genome*, *Science* 345 (6194), 1251788, 2014.
- Nature Biotechnology 2012, *Agnostic about agriculture*, vol. 30, n. 3, p. 197.
- Perata P., Alpi A. (1993), *Plant responses to anaerobiosis*, *Plant Sci.* 93: 1-17.
- Pozzi C., Faccioli P., Terzi V., Stanca A.M., Cerioli S., Castiglioni P., Fink R., Capone R., Müller K.J., Bossinger G., Rohde W., Salamini F. (2000), *Genetics of mutations affecting the development of a barley floral bract*, *Genetics*, 154(3): 1335-1346.
- Rizza F., Badeck F.W., Cattivelli L., Lidestri O., Di Fonzo N., Stanca A.M. (2004), *Use of a Water Stress Index to Identify Barley Genotypes Adapted to Rainfed and Irrigated Conditions*, *Crop Science*, vol. 44, no. 6, pp. 2127-2137.
- Stanca A.M., Marocco A., Pecchioni N., Valè G., Odoardi M., Faccioli P., Cattivelli L., Terzi V. (2014), *Genetica Vegetale*, Genetica, S. Pimpinelli, Milano, Casa Editrice Ambrosiana, pp. 155-221.
- Stanca A.M. (2015), *La scienza e le biotecnologie vegetali saranno pronte per assicurare alimenti alla popolazione mondiale nel 2050?*, EAI: 2-13.
- Stanca A.M., Francia E., Tondelli A., Badeck F.W., Terzi V. (2017), *Progress in small grain cereals: a case study*, in: R. Pilu and G. Gavazzi (eds.), *More food: road to survival*, chapter 17, 578-604, BSP Publ.
- Terzi V., Morcia C., Giovanardi D., D'Egidio M.G., Stanca A.M., Faccioli P. (2004), *DNA-based analysis for authenticity assessment of monovarietal pasta*, *European Food Research and Technology*, 219 (4): 428-431.
- Terzi V., Tumino G., Pagani D., Rizza F., Ghizzoni R., Morcia C., Stanca A.M. (2017), *Barley Developmental Mutants: The High Road to Understand the Cereal Spike Morphology*, *Diversity*, 9(2) 21.
- Tundo S., Kalunke R., Janni M., Volpi C., Lionetti V., Bellincampi D., Favaron F., D'Ovidio R. (2016), *Pyramiding PvPGIP2 and TAXI-III but not PvPGIP2 and PME1 enhances resistance against Fusarium graminearum*, *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2016, vol. 29, no. 8, pp. 629-639.
- Verrillo F., Badeck F.-W., Terzi V., Rizza F., Bernardo L., Di Maro A., Fares C., Zaldei A., Miglietta F., Moschella A., Bracale M., Vannini C. (2017), *Elevated field atmospheric CO₂ concentrations affect the characteristics of winter wheat (cv. Bologna) grains*, *Crop & Pasture Science* 68: 713-725.
- Vitolo N., Stanca A.M. et al. (2011), *First survey of the wheat chromosome 5A composition through a next generation sequencing approach*, *PLoS one* 6(10):e26421.
- Westengen O.T. et al. (2013), *Global ex-situ crop diversity conservation and the Svalbard Global Seed Vault: assessing the current status*, *PLoS one* 8(5): e64148.
- Wolters P.J. et al. (2013), *Evidence for regulation of columnar habit in apple by a putative 2OG-Fe(II) oxygenase*, *New Phytol.* 200: 993-999.
- Zhang G.Q. et al. (2017), *The Apostasia genome and the evolution of orchids*, *Nature* 549 (7672), pp. 379-383.

A. MICHELE STANCA

Nasce a Soletto (LE) il 22 maggio 1942. Laurea in Scienze agrarie - Università di Bari. Direttore, sino al 2009, del Centro di ricerca per la genomica e la postgenomica animale e vegetale di Fiorenzuola d'Arda del CREA Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria. Ha svolto attività di ricerca in genetica, fisiologia e biologia molecolare sull'adattamento delle piante all'ambiente e di genomica strutturale e funzionale, di proteomica e crop systems biology per l'identificazione e analisi della funzione di geni e proteine coinvolti nella espressione di caratteri di rilevanza agronomica. Ha sviluppato programmi di miglioramento genetico convenzionale e molecolare (MAS), costituendo varietà di orzo di successo a livello nazionale ed internazionale.

*Autore di circa 400 pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali e internazionali, libri e capitoli di libri. Membro dell'International Barley Genetics Committee e della European Barley Genome Net. Attualmente è Professore a contratto gratuito di "Miglioramento genetico e OGM in agricoltura" presso l'Università di Modena e Reggio Emilia.
Accademico dell'Accademia Nazionale di Agricoltura di Bologna;*

Accademico dell'Accademia degli Incamminati di Modigliana; Vice Presidente dell'Accademia dei Georgofili di Firenze; Presidente della Unione Nazionale delle Accademie per le Scienze Applicate allo Sviluppo dell'Agricoltura, alla Sicurezza alimentare ed alla Tutela Ambientale (UNASA).

Contatti: E-mail: michele@stanca.it