

# Tecnologie di Evoluzione Assistita

la nuova via  
per la sostenibilità  
dell'agricoltura italiana

Con le TEA, Tecnologie  
di Evoluzione Assistita,  
ogni «ambiente» avrà  
la varietà più adatta

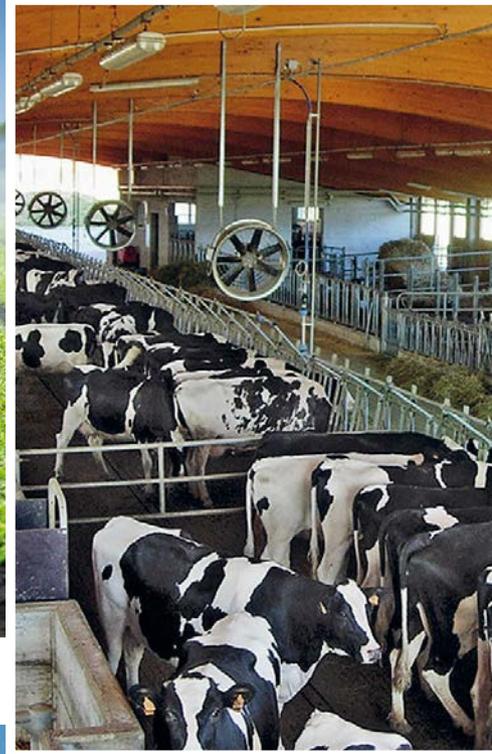


Un'iniziativa di:



Con il supporto di:





# L'INFORMATORE AGRARIO

DAL 1945  
LIBERO, COMPETENTE, INNOVATIVO



Da oltre 75 anni  
il settimanale  
indipendente al servizio  
dell'agricoltura italiana

**L'INFORMATORE  
AGRARIO**

DAL 1945  
LIBERO, COMPETENTE, INNOVATIVO

[www.informatoreagrario.it](http://www.informatoreagrario.it)

Fondato nel 1945  
da Alberto Rizzotti

**Direttore responsabile:** Antonio Boschetti  
**Comitato scientifico:** Felice Adinolfi, Valerio Cristofori,  
Giuseppe Colla, Francesco Marinello, Nicola Mori,  
Stefano Poni, Amedeo Reyneri.

**Giornalisti:** Nicola Castellani (capo servizio),  
Marco Limina (capo servizio), Lorenzo Andreotti,  
Alberto Andrioli, Giannantonio Armentano.

**Redazione:** Susanna Muraro (coordinatrice),  
Emilia Carotenuto, Emanuela Galiotto,  
Patrizia Meneghetti, Elisa Sancassani,  
Maddalena Toffoli, Alberto Zandomeneghi.

**Segreteria di Redazione:** Giulliana Fasoli.

**Ufficio impaginazione:** Mattia Bechelli (coordinatore),  
Mauro Fianco, Daniele Dusi.

**Sede redazione:** Via Bencivenga-Biondani, 16 - 37133  
Verona - Tel. 045.8057547

**E-mail:** [informatoreagrario@informatoreagrario.it](mailto:informatoreagrario@informatoreagrario.it)

**Internet:** [www.informatoreagrario.it](http://www.informatoreagrario.it)

**Edizioni L'Informatore Agrario Srl**  
Via Bencivenga-Biondani, 16 - 37133 Verona

**Presidente:** Elena Rizzotti

**Amministratori delegati:** Umberto Caroleo,  
Elena Rizzotti

**Direttore Commerciale:** Pier Giorgio Ruggiero

**Sales manager:** Dario Zoppi

**Pubblicità:** Tel. 045.8057523

**E-mail:** [pubblicita@informatoreagrario.it](mailto:pubblicita@informatoreagrario.it)

**Progetto grafico:** Claudio Burlando - curiositas.it

**Stampa:** Mediagraf spa - Noventa Padovana

Registrazione Tribunale di Verona n. 46 del 19-9-1952.  
Poste Italiane spa - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003 (conv. in L.  
27-2-2004 n. 46) Art. 1, Comma 1, DCB Verona.

ISSN 0020-0689 - Copyright © 2021 L'Informatore  
Agrario di Edizioni L'Informatore Agrario srl.

Vieta la riproduzione parziale o totale di testi  
e illustrazioni a termini di legge.

#### QUOTE DI ABBONAMENTO 2021

Italia: un anno, € 109,00 (42 numeri)

Estero: su richiesta a [clienti@ediagroup.it](mailto:clienti@ediagroup.it)

Sono previste speciali quote di abbonamento  
per studenti di ogni ordine e grado  
(per informazioni rivolgersi al Servizio Clienti).

Una copia (numero + event. supplemento): € 3,50.

Copie arretrate: € 7,00 (per gli abbonati € 5,00) cadauna.

Aggiungere un contributo di € 3,50 per spese postali,  
indipendentemente dal numero di copie ordinate.

#### Come abbonarsi:

• [www.ediagroup.it/miabbonxxAAo](http://www.ediagroup.it/miabbonxxAAo) con carta di credito  
Visxxa, Mastercard, American Express, PayPal, PostePay  
o MyBank.

• Conto corrente postale n. 10846376 intestato a  
Edizioni L'Informatore Agrario srl - L'Informatore  
Agrario - Serv. Abbonamenti.

L'ordine di abbonamento o di copie può essere fatto  
rivolgendosi direttamente al Servizio Clienti.

#### Servizio Clienti:

Tel. 045.8009480 dalle 8.30 alle 13.00  
e dalle 14.00 alle 17.30 dal lunedì al venerdì.  
[clienti@ediagroup.it](mailto:clienti@ediagroup.it) - [www.ediagroup.it/faq](http://www.ediagroup.it/faq)

**Agli abbonati informativa ai sensi del Regolamento  
europeo per la protezione dei dati personali n. 2016/679.**  
I dati personali da Lei forniti verranno trattati da Edizioni L'Informatore  
Agrario srl, con sede in Verona, via Bencivenga-Biondani, 16, sia  
manualmente che con strumenti informatici per gestire il rapporto  
di abbonamento nonché per informarla circa iniziative di carattere  
editoriale e promozionale che riteniamo possano interessarla.  
Lei potrà rivolgersi ai sottoscritti per far valere i diritti previsti dal  
Regolamento europeo per la protezione dei dati personali n. 2016/679.  
Informativa completa su [www.ediagroup.it/privacy](http://www.ediagroup.it/privacy)

# Tecnologie di Evoluzione Assistita



## IN QUESTO NUMERO

### 5 • Coltivatori e ricercatori uniti per il rilancio dell'agricoltura

**Ettore Prandini**

Coldiretti

**Mario Enrico Pé**

Scuola Superiore Sant'Anna (Pisa)

Presidente SIGA

### 6 • TEA e OGM sono diversi

**Paolo De Castro**

Parlamento europeo

### 7 • TEA, miglioramento genetico preciso e veloce



**Fabio Fornara**

Dipartimento di Bioscienze  
Università degli Studi di Milano

**Michela Janni**

Istituto di Bioscienze e Biorisorse  
CNR Bari

**Gianpiero Marconi, Daniele Rosellini**

Dipartimento di Scienze Agrarie,  
Alimentari e Ambientali  
Università di Perugia

**Chiara Volpi**

Enza Zaden Italia Ricerca srl  
Sede di Tarquinia (Viterbo)

### 11 • Il rilancio della cerealicoltura passa anche dalle TEA



**Raffaella Battaglia**

CREA, Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica  
Fiorenzuola d'Arda (Piacenza)

**Marco Maccaferri**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari  
Università di Bologna

**Stefania Masci, Francesco Sestili**

Dipartimento di Scienze Agrarie e Forestali  
Università della Tuscia, Viterbo

**Alessandro Tondelli**

CREA, Centro di ricerca Genomica e Bioinformatica  
Fiorenzuola d'Arda (Piacenza)

**14 • Mais e riso più competitivi grazie alle TEA****Carlotta Balconi**

CREA, Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali  
Sede di Bergamo

**Fabio Fornara**

Dipartimento di Bioscienze  
Università degli Studi di Milano

**Silvio Salvi**

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari  
Università di Bologna

**Patrizia Vaccino**

CREA, Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali  
Sede di Vercelli

**Serena Varotto**

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e Ambiente  
Università di Padova

**17 • Colture orticole: le TEA per rispondere ai cambiamenti****Teodoro Cardi**

CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo  
Sede di Pontecagnano (Salerno)

**Edgardo Filippone**

Dipartimento di Agraria  
Università Federico II di Napoli

**Chiara Volpi**

Enza Zaden Italia Ricerca srl  
Sede di Tarquinia (Viterbo)

**21 • Con le TEA leguminose più produttive e nutritive****Massimo Confalonieri**

CREA, Centro di ricerca Zootecnia e Acquacoltura  
Sede di Lodi

**Giovanna Frugis**

Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, Roma

**Domenica Nigro, Stefano Pavan**

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

**Daniele Rosellini**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali  
Università di Perugia

**Francesca Sparvoli**

Istituto Biologia e Biotecnologia Agraria, CNR, Milano

**23 • Le TEA porteranno a viti più resistenti alle avversità****Riccardo Aversano**

Dipartimento di Agraria  
Università Federico II di Napoli

**Maria Francesca Cardone**

CREA, Centri di ricerca Viticoltura ed Enologia  
Sede di Bari

**Michele Morgante**

Dipartimento di Scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali  
Università di Udine

**Claudio Moser**

Fondazione Edmund Mach  
San Michele all'Adige (Trento)

**Irene Perrone**

Istituto per la protezione sostenibile delle piante, CNR - Torino

**Riccardo Velasco**

CREA, Centri di ricerca Viticoltura ed Enologia  
Sede di Conegliano Veneto (Treviso)

**Sara Zenoni**

Dipartimento di Biotecnologie  
Università di Verona

**26 • Grazie alle TEA la frutticoltura può essere 2.0****Mickael Malnoly**

Fondazione Edmund Mach  
San Michele all'Adige (Trento)

**Sabrina Micali**

CREA, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura  
Sede di Roma

**Anna Paola Minervini**

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

**Elisa Vendramin, Ignazio Verde**  
CREA, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura ed Agrumicoltura  
Sede di Roma

**28 • Anche gli agrumi in corsa verso le TEA****Alessandra Gentile**

Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente  
Università di Catania

**Concetta Licciardello**

CREA, Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura  
Sede di Acireale (Catania)

**Angela Roberta Lo Piero**

Dipartimento di Agricoltura, Alimentazione e Ambiente  
Università di Catania

**31 • Lo stato delle TEA nella ricerca e nel panorama legislativo****Fabio Fornara**

Dipartimento di Bioscienze  
Università degli Studi di Milano

**Daniele Rosellini**

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali  
Università di Perugia

# Coltivatori e ricercatori uniti per il rilancio dell'agricoltura

**L**a presente pubblicazione è uno dei frutti dell'accordo siglato tra Coldiretti e SIGA a sostegno delle tecnologie di miglioramento genetico basate su cisgenesi e genome editing e vuole fornire in modo semplice, ma scientificamente appropriato, informazioni su queste nuove tecnologie e su come esse consentano di raccogliere la sfida aperta dall'UE per un sistema agroalimentare salubre e resiliente. Queste tecnologie consentono modificazioni dirette dell'informazione genetica (DNA) delle piante coltivate, riproducendo gli effetti dei meccanismi alla base dell'evoluzione biologica naturale, ovvero mutazioni del DNA e scambio di geni tra individui sessualmente compatibili. Per questo motivo le abbiamo chiamate Tecnologie di Evoluzione Assistita – TEA. L'accordo a sostegno delle TEA ha lo slogan «Camici e Trattori» e la sua valenza deriva dalla consapevolezza condivisa

che l'agricoltura europea debba affrontare in modo più efficace le sfide poste dai cambiamenti climatici e dalle esigenze della transizione ecologica. Questa trasformazione richiede un deciso cambiamento di passo anche nel nostro Paese. La qualità indiscussa e la varietà dei prodotti insieme alla capacità imprenditoriale degli operatori del settore hanno reso il made in Italy agroalimentare invidiato e copiato in tutto il mondo. La pandemia da Covid-19 stimola la riflessione sulla necessità di aumentare in modo sostenibile la produzione agricola nazionale, affinché il made in Italy non sia così dipendente dalle importazioni. È necessario immaginare il futuro dell'agricoltura italiana. Noi riteniamo che esso debba poggiare senz'altro sulla digitalizzazione delle pratiche colturali attraverso l'applicazione dell'information technology, ma anche sull'impiego di nuove varietà adatte alle diverse esigenze e alle svariate condizioni di coltivazione. Le TEA offrono straordinarie opportunità e sembrano fatte apposta per salvaguardare e promuovere la diversità della nostra agricoltura e la pluralità delle vocazioni produttive dei territori. Per le loro specifiche modalità di

azione, le TEA permettono di introdurre i miglioramenti genetici desiderati mantenendo inalterate le caratteristiche distintive di ogni varietà. Le TEA sono precise e veloci, consentono di ottenere una varietà migliorata, anche arborea, a costi decisamente inferiori rispetto al miglioramento tradizionale; possono essere applicate efficacemente sulle varietà tipiche della nostra agricoltura di qualità, molte delle quali sono oggi a rischio per la loro scarsa produttività e la suscettibilità a malattie. Si favorirebbe così il mantenimento e

la valorizzazione della ricca agrobiodiversità nazionale, consentendo anche la partecipazione di soggetti locali ai progetti di miglioramento varietale. Sulle TEA pesa un giudizio della Corte di giustizia europea che assimila i prodotti delle TEA agli ogm, rendendoli soggetti alla legislazione che ne regola produzione e diffusione, pertanto l'agricoltura europea rischia di non poter usufruire di questa grande opportunità di rinnovamento varietale.



**Mario Enrico Pè**, presidente di SIGA (a *sinistra*) ed **Ettore Prandini**, presidente nazionale di Coldiretti

Le istituzioni europee dovranno decidere se le TEA debbano o meno sottostare a una regolamentazione decisa 20 anni fa, che ovviamente non può tener conto degli avanzamenti avvenuti nel frattempo. Questa pubblicazione è un contributo affinché i diversi portatori di interesse, l'opinione pubblica e la classe politica del nostro Paese possano prendere decisioni consapevoli derivanti da conoscenze scientifiche e tenuto conto delle aspettative degli agricoltori. È doveroso da parte nostra ringraziare *L'Informatore Agrario* per aver dato il suo convinto supporto editoriale all'iniziativa, il gruppo di comunicazione di Coldiretti, le autrici e gli autori dei vari capitoli, le socie e i soci della SIGA che hanno condiviso informazioni, dati e immagini. Un particolare ringraziamento lo rivolgiamo ai Prof.ri Michele Morgante e Mario Pezzotti, i precedenti Presidenti della SIGA, convinti assertori del ruolo sociale delle società scientifiche senza i quali questo supplemento non sarebbe stato nemmeno concepito. Infine desideriamo ringraziare Bayer Italia per aver contribuito a rendere possibile la pubblicazione di questo supplemento.

● LA RISPOSTA A CAMBIAMENTI CLIMATICI E SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE

# TEA e OGM sono diversi

**P**er il futuro di un'agricoltura europea più sostenibile e green è ormai solo questione di tempo. E l'apertura sul piano normativo alle New breeding techniques (Nbt) o Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) sarà la cartina di tornasole di un confronto, in atto ormai da anni, tra chi ne ostacola per motivi ideologici la loro applicazione e chi le sostiene con l'avallo della comunità scientifica internazionale. Ma soprattutto con riconosciuti benefici ambientali ed economici per gli agricoltori e per tutti i cittadini-consumatori che ogni giorno portano a tavola prodotti agroalimentari frutto di conoscenza e innovazione.

### Verso un nuovo quadro giuridico

Un primo importante colpo di acceleratore al dibattito tra sostenitori e detrattori di queste tecnologie, è stato impresso l'aprile scorso da un rapporto diffuso dalla Dg Agri della Commissione europea. Uno studio caratterizzato – finalmente – da una posizione chiara e netta sulla distinzione tra nuove biotecnologie e organismi geneticamente modificati (OGM), che secondo noi aiuterà a raggiungere gli obiettivi del Green Deal europeo e della strategia Farm to Fork nell'interesse di tutti.

Partendo da questo report, **l'esecutivo UE ha detto di voler avviare un processo di consultazione finalizzato a un nuovo quadro giuridico per le biotecnologie agrarie. E quindi arrivare a una proposta legislativa entro la primavera 2022**, coinvolgendo il Consiglio e il Parlamento UE in qualità di colegislatori, che chiarisca una volta per tutte come le nuove tecniche genomiche non hanno nulla a che vedere con gli OGM tradizionali e, anzi, possono contribuire in modo sicuro ed efficace a una produzione agricola sempre più sostenibile, in linea con il Patto con i consumatori lanciato dall'Unione.

Intanto, **come Parlamento europeo, con il voto sul Farm to Fork previsto il prossimo ottobre evidenzieremo la nostra posizione**, augurandoci che la proposta di legge UE sia realmente ispirata al rapporto pubblicato dalla Dg

Entro la primavera del 2022 la Commissione Europea avanzerà una proposta di nuovo quadro giuridico per le biotecnologie agrarie, ma il Parlamento a ottobre manifesterà intanto la propria posizione. Le TEA ci consentiranno di produrre di più riducendo l'impatto ambientale dell'agricoltura

Agri. Superando la vecchia legislazione in materia e una sentenza della Corte di giustizia UE del 2018 che non chiariva sul piano normativo la differenza tra TEA e OGM tradizionali.

Alla base dello studio della Commissione c'è l'evidenza scientifica dei progressi compiuti dalla ricerca negli ultimi vent'anni in materia di biotecnologie; progressi che di fatto rendono obsoleta la legislazione sugli OGM risalente al 2001. Le nuove biotecnologie sostenibili, infatti, a differenza degli OGM tradizionali che prevedono il trasferimento di geni (transgenesi) tra specie diverse, si basano sulla combinazione di geni intraspecifici (o sulla mutagenesi), con l'obiettivo di velocizzare processi che avverrebbero comunque in modo naturale. Con le nuove biotecnologie possiamo sviluppare varietà, non solo sicure da un punto di vista della tutela ambientale e della biodiversità, ma soprattutto più resistenti a malattie e condizioni climatiche avverse, come la carenza d'acqua, e capaci di garantire maggiori rese produttive e quindi minori costi economici.

Chi si ostina ad assimilare gli OGM con le Nbt, o TEA, richiamando il principio di precauzione, si rifà a prese di posizione di retroguardia o a informazioni fuorvianti non più sostenibili. Ricordo che il principio di precauzione richiamato da alcune associazioni ambientaliste e del settore biologico è lo stesso che tutti noi, in Italia, decidemmo di anteporre anni fa quando met-

temmo al bando gli OGM, ritenendoli non necessari. E lo stesso principio di precauzione viene rispettato dalle nuove biotecnologie agrarie, per le quali nel 2020 – non a caso – due ricercatrici sono state insignite del Premio Nobel. E questo perché la comunità scientifica internazionale ha riconosciuto lo straordinario contributo nella creazio-

ne di nuove varietà nel solco del miglioramento genetico tradizionale.

È grazie a queste tecnologie e alla conoscenza del genoma di molte colture che sarà possibile esaltare la biodiversità e ridurre l'impiego della chimica nei campi. Tra l'altro, queste tecnologie non richiedono investimenti colossali, sostenibili solo dalle multinazionali, e consentono di mettere a punto nuove

varietà anche a istituti sperimentali e piccole aziende sementiere e produttrici di presidi fitosanitari.

Obiettivi, questi, che a ben vedere sono anche quelli indicati nella strategia Farm to Fork lanciata dall'UE nel quadro del New Green Deal: un patto fra agricoltori e consumatori, dal campo alla tavola, supportato anche da queste tecnologie per raggiungere target ambiziosi, come la riduzione del 50% di fitofarmaci e del 20% di fertilizzanti chimici, e l'aumento ad almeno il 25% della superficie coltivata con metodo biologico.

**Paolo De Castro**



Paolo De Castro, europarlamentare

● PER AFFRONTARE SOSTENIBILITÀ AMBIENTALE E CAMBIAMENTO CLIMATICO

# TEA, miglioramento genetico preciso e veloce

**I**l comparto agricolo mondiale è messo seriamente in difficoltà dalla necessità di garantire la sicurezza alimentare a una popolazione in costante aumento che raggiungerà i 9,7 miliardi nel 2050 (dati Fao 2020). Per soddisfare questa necessità le produzioni agricole dovranno aumentare a fronte di una sempre ridotta superficie coltivabile e del forte impatto che i cambiamenti climatici hanno sulla quantità e qualità delle produzioni.

I cambiamenti climatici comportano una serie di alterazioni di diversi fattori quali la temperatura, le precipitazioni e la concentrazione di anidride carbonica e sono responsabili anche di modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo e dell'acqua di irrigazione. Secondo un recente rapporto dell'Agenzia europea per l'ambiente, l'area mediterranea è tra le aree più colpite dai cambiamenti climatici, non solo per l'entità dei fenomeni meteorologici straordinari, ma anche perché sarà sempre più soggetta a prolungate ondate di calore, con una riduzione stimata fino al 50% delle rese di alcune colture chiave come frumento, mais e fruttiferi.

L'ultimo decennio ha fatto registrare stagioni particolarmente secche con perdite produttive ingenti che, secondo Coldiretti, sono state stimate pari a 14 miliardi di euro.

**I cambiamenti climatici, e in particolare il surriscaldamento globale, hanno inoltre rilevanti conseguenze sull'attività e sui cicli produttivi dei patogeni delle piante, aumentando l'aggressività.** Casi eclatanti sono quelli del punteruolo rosso, della cimice asiatica, della *Xylella fastidiosa*, che stanno avendo effetti disastrosi e hanno già causato ingenti danni.

In questo scenario globale è inoltre importante tenere conto delle preferenze dei consumatori. L'innovazione tecnologica e la diversificazione varietale sono necessarie per far fronte alla segmentazione dei mercati e alle varieghe richieste dei consumatori, che cambiano nel tempo per fascia di

età, per tipologia di dieta e molto altro. La crescente sensibilità del consumatore per le proprietà nutrizionali e salutistiche degli alimenti, per la derivazione dei prodotti e la sostenibilità delle produzioni, indirizza largamente le scelte di mercato e le produzioni.

Le sfide sono enormi, ma siamo convinti di avere gli strumenti per affrontarle efficacemente. Gli sviluppi di meccanica, biotecnologie, chimica e informatica, uniti a una crescente conoscenza del sistema suolo, di animali, piante e microrganismi, mettono a disposizione strumenti eccezionali.

I più recenti sono costituiti dalle tecnologie dell'editing genomico, da noi ribattezzate Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), a nostro avviso uno dei pilastri sui quali costruire l'agricoltura italiana del rilancio post Covid19, nel solco della transizione ecologica.

Del resto, il miglioramento genetico è sempre stato un forte propulsore di innovazione in agricoltura.

Del resto, il miglioramento genetico è sempre stato un forte propulsore di innovazione in agricoltura.

## Dalla domesticazione al miglioramento genetico

Verso la fine dell'ultima glaciazione, all'incirca 10.000 anni fa, in tre aree del mondo inizia, in modo relativamente sincrono, quella che va sotto il nome di rivoluzione Neolitica. In quel periodo avviene il più grande cambiamento nella storia dell'uomo dal punto di vista tecnologico, culturale e sociale.

L'invenzione dell'agricoltura porta alla domesticazione delle piante con la selezione di caratteristiche vantaggiose. I caratteri fondamentali per la sopravvivenza nelle condizioni naturali, come la dormienza e la dissemi-



**Foto 1** Spiga dell'antenato selvatico del mais, il teosinte (a **sinistra**), a confronto con il mais domesticato primitivo (a **destra**)  
(fonte: Després et al. Science: 302, 2003)

**Foto 2** Frutto del pomodoro selvatico *Solanum pimpinellifolium* (a **sinistra**), a confronto con una varietà di pomodoro moderna (a **destra**)  
(fonte: Doebley et al. Cell. 127, 2006)



**Foto 3** Campo per il miglioramento genetico del sorgo dell'Istituto internazionale di ricerca per le colture delle aree tropicali secche (Icrisat). Migliaia di piante con l'infiorescenza coperta da sacchetti per consentire incroci controllati dai quali ottenere delle progenie da sottoporre a selezione. Nei centri di miglioramento genetico ci sono decine e decine di campi di questo genere

nazione dei semi furono eliminati, a favore di altri quali la dimensione di frutti e semi, l'uniformità di sviluppo e di germinazione, l'appetibilità e il valore nutritivo. Tale decisivo processo fu possibile sfruttando mutazioni genetiche spontanee, naturali, del tutto casuali, che l'occhio attento e interessato dei nostri progenitori fu in grado di selezionare e migliorare per millenni (foto 1 e 2).

Un passaggio decisivo nella storia del miglioramento genetico si ebbe nel periodo che va dalla metà del 1800 ai primi del 1900 con la costituzione, a partire da piante singole, di varietà coltivate di frumento e avena.

È proprio all'inizio del 900 che in Italia Nazareno Strampelli (1866-1942) applica al miglioramento delle specie di interesse agrario le riscoperte leggi mendeliane dell'ereditarietà dei caratteri.

Strampelli avvia un eccezionale programma di miglioramento genetico del frumento tenero basato sull'incrocio di varietà con caratteristiche differenti, seguito dalla selezione di linee pure, varietà omogenee dotate simultaneamente di tratti quali resistenza alle ruggini, resistenza all'allettamento e precocità di maturazione. Le sue varietà di

frumento oltre a raddoppiare la produttività del frumento in Italia, divennero ben presto materiale genetico prezioso per molti programmi di miglioramento in varie parti del mondo, come Canada, Australia e Stati Uniti, Unione Sovietica e Cina.

Norman Borlaug (1914-2009), considerato il padre della rivoluzione verde e premio Nobel per la pace, a partire dalla fine della Seconda guerra mondiale baserà la costituzione delle sue varietà ad alta produttività sugli stessi caratteri di taglia bassa, precocità e resistenza alle ruggini migliorati da Nazareno Strampelli. Il miglioramento



genetico non si è mai fermato, impiegando via via conoscenze sempre più approfondite e tecnologie più efficaci.

## I vantaggi delle TEA

Tutti i metodi e le tecniche di miglioramento hanno l'obiettivo di generare variabilità genetica che permetterà poi di selezionare nuove varietà con nuove caratteristiche utili (vedi riquadro a pag. 9). Il miglioramento genetico moderno richiede tempi molto lunghi e ingenti risorse sia umane sia economiche: il tempo medio tra l'inizio di un programma di miglioramento genetico classico e la commercializzazione di una nuova varietà è intorno ai 10 anni (foto 3).

Che cosa hanno di speciale le TEA da giustificare così grandi aspettative di innovazione?

**La valenza rivoluzionaria delle TEA sta nella loro capacità di modificare in maniera mirata, precisa, efficiente, flessibile, veloce e relativamente poco costosa l'informazione genetica che controlla le caratteristiche di una pianta,** in definitiva di modificare

a piacere un tratto di DNA inducendo delle variazioni genetiche specifiche. Il controllo della variabilità genetica è sempre stato il sogno nel cassetto dei genetisti agrari, che da oltre un secolo si sono ingegnati a sviluppare conoscenze e metodologie per capirla, controllarla e sfruttarla.

La scoperta di forbici molecolari programmabili, sulle quali si basano le TEA, fa pensare che forse questo sogno si sta realizzando. È immediatamente evidente come questa capacità di modificare a piacere le caratteristiche di una pianta possa trasformarsi in uno strumento potentissimo e irrinunciabile della cassetta degli attrezzi del miglioramento genetico moderno.

## Come funzionano le forbici molecolari

Il premio Nobel per la Chimica del 2020 è stato attribuito a Jennifer Doudna e a Emmanuelle Charpentier per la scoperta di un particolare meccanismo, denominato CRISPR-Cas9, che molti batteri e Archea hanno evoluto per contrastare l'infezione da parte di virus batterici, chiamati batteriofagi.

I batteriofagi, come tutti i virus, sono parassiti molecolari e utilizzano i processi cellulari dell'ospite per riprodursi. Ciò avviene quando il batteriofago inietta all'interno della cellula batterica il proprio DNA.

I batteri si difendono dai batteriofagi producendo delle proteine che riconoscono il DNA virale come estraneo e lo tagliano, inattivandolo. Queste **proteine, chiamate endonucleasi, sono le cosiddette forbici molecolari**. Doudna e Charpentier hanno scoperto e caratterizzato un tipo particolare di forbice molecolare (la proteina Cas9) che riesce a riconoscere e tagliare il DNA dei batteriofagi con i quali sono entrati in contatto in precedenza, e funziona quindi come un meccanismo di difesa immunitaria.

La specificità di taglio della forbice molecolare è data da una molecola di RNA di circa 100 nucleotidi (l'elemento base che costituisce l'RNA e il DNA), che prende il nome di RNA guida (gRNA).

Questo RNA, che si lega spontaneamente alla proteina Cas9, contiene al suo interno una sequenza di 20 nucleotidi complementare a un tratto specifico del DNA del batteriofago.

Il legame chimico tra queste due brevi sequenze stabilizza il complesso, portando la forbice molecolare sul bersaglio: un meccanismo semplice ed efficiente.

Il complesso Cas9 + gRNA è alla base dell'editing genomico. Infatti, per modificare un particolare gene è sufficiente sintetizzare un gRNA che contenga una sequenza complementare al gene bersaglio e che guidi la forbice molecolare sul gene: combinato a quello specifico gRNA l'enzima Cas9 si legherà al DNA soltanto nel punto desiderato dove determinerà il taglio della doppia elica di DNA.

La specificità è tale che la sequenza da modificare è riconosciuta con precisione anche se essa è all'interno di un genoma composto da centinaia di milioni se non miliardi di nucleotidi.

Le TEA quindi agiscono sul genoma nello stesso modo in cui uno scrittore interviene su un testo, modificando lettere e parole per cambiare il significato di una frase.

La modifica di singoli nucleotidi tra i milioni o miliardi che compongono il genoma, può determinare nella pianta così modificata l'insorgenza delle caratteristiche desiderate.

## Gli strumenti utilizzati dai genetisti

Il miglioramento genetico delle piante coltivate si avvale di diversi metodi e tecnologie che sono in costante evoluzione.

Le tecniche di miglioramento convenzionali comprendono gli incroci intra e inter-specifici, l'ibridazione somatica, la mutagenesi mediante l'uso di mutageni chimici e fisici e l'induzione della poliploidia (raddoppiamento del numero dei cromosomi). Per accelerare i procedimenti di selezione il miglioratore, grazie alle conoscenze di genetica, genomica e biologia molecolare, può utilizzare la selezione assistita da marcatori

molecolari (MAS), che utilizza frammenti di DNA associati a determinati geni per tracciare e selezionare in modo efficiente le piante migliori. Le tecnologie cellulari facilitano l'ottenimento dei doppi aploidi (linee pure omozigoti ottenute da un genitore eterozigote a partire dai suoi gameti in una sola generazione), la produzione di materiale vegetale esente da virus, la rapida propagazione di cloni e genotipi di pregio, e permettono di realizzare l'ingegneria genetica, modificando il DNA all'interno di singole cellule coltivate in vitro, da cui si dovrà rigenerare una pianta intera. ●



### Quale modificazioni si possono indurre?

**Inattivazione di un gene.** La rottura della doppia elica del DNA è un evento molto dannoso per la cellula, che attiva immediatamente i propri meccanismi molecolari di riparazione. Le due estremità del DNA tagliato sono avvicinate e ricucite tra loro. Questo meccanismo di riparazione, definito Non Homologous end Joining, è impreciso e alcuni nucleotidi possono essere persi o aggiunti. Questi errori capitano con una frequenza elevata e possono portare all'inattivazione del gene e all'alterazione del carattere che quel gene controlla.

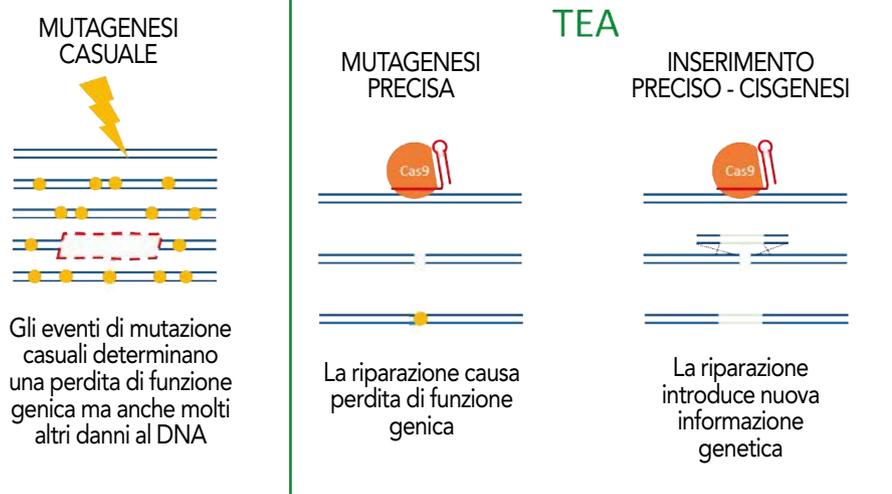
Utilizzando il complesso Cas9-gRNA, possono essere introdotte mutazioni nei geni di interesse con effetti molecolari del tutto identici, ma mirati, rispetto a quelli prodotti dalla mutazio-

ne spontanea o indotta (figura 2, a sinistra). Questo approccio è, ad esempio, particolarmente efficace per inattivare un gene necessario all'infezione di un patogeno, producendo così una pianta resistente a quel patogeno.

**Sostituzione di una sequenza e inserimento mirato di geni.** La rottura del DNA e il sistema di riparazione possono essere utilizzati per sostituire un tratto di DNA con un altro che porta un'informazione diversa. Ciò si può realizzare sfruttando il meccanismo di ricombinazione omologa, introducendo nelle cellule, oltre al complesso Cas9 + gRNA, un tratto di DNA che salda le due estremità precedentemente rotte (figura 1, a pagina 10).

Le TEA offrono in questo caso la possibilità di inserire nuova informazione ge-

FIGURA 1 - Confronto tra mutagenesi convenzionale e TEA



La mutagenesi chimica o fisica (a **sinistra**) introduce molte alterazioni casuali nel DNA. Il complesso Cas9 + gRNA (al **centro**) introduce solo la mutazione desiderata nel gene di interesse. La modificazione del gene può permettere la sostituzione di un tratto di DNA in corrispondenza del taglio (a **destra**)

netica in modo preciso, sostituendo porzioni di DNA, da una o poche lettere a intere parole del codice genetico. Questa strategia permette anche di realizzare la cisgenesi (vedi riquadro a fianco), che è particolarmente efficace per valorizzare la diversità genetica presente nelle specie selvatiche, senza dover intraprendere programmi di miglioramento genetico molto lunghi e di esito incerto.

## Dalle cellule alla pianta intera

Una volta ottenute le cellule con le modificazioni desiderate è necessario ottenere da queste una pianta intera



Foto 4 Le colture *in vitro* sono fondamentali per l'applicazione delle TEA a diverse varietà

## COS'È LA CISGENESI?

Una particolare modalità di inserimento di geni è la cisgenesi. I geni inseriti, in questo caso, sono prelevati, in laboratorio, da una specie sessualmente compatibile e inseriti inalterati nella specie ospite. Un esempio di successo di applicazione della cisgenesi è la varietà di melo Gala resistente alla ticchicoltura (una grave malattia fungina), ottenuta trasferendo un gene prelevato dalla specie selvatica *Malus floribunda*.

Un risultato simile potrebbe essere teoricamente ottenuto anche con il classico incrocio, ma con tempi lunghi ed esiti incerti.

Per fare un altro esempio che riguarda la viticoltura, con la cisgenesi è possibile ottenere un Merlot resistente alla peronospora inserendo un solo gene proveniente da una vite selvatica; l'alternativa è fare un incrocio tra il Merlot e la vite selvatica, quindi reincrociare più volte gli ibridi resistenti con il Merlot, senza poterne recuperare interamente le caratteristiche originali e impiegando una quindicina di anni.

a seconda delle esigenze e dei contesti socio-culturali e ambientali.

Da quanto descritto non dovrebbe essere sfuggito il fatto che le TEA, oltre a produrre piante migliorate, sono uno strumento potentissimo per la ricerca di base e per scoprire la funzione dei geni attraverso la loro mutazione. Quindi possiamo immaginare che le TEA possano esse stesse contribuire, potenziando la ricerca di base, ad aumentare la loro efficienza e versatilità.

Infine, è importante sottolineare che con le TEA le conoscenze sulla diversità genetica e sui genomi delle piante coltivate possono essere messe a frutto in modo preciso ed efficiente, recuperando anche varietà tradizionali non più coltivabili a causa della loro non adeguatezza alle nuove esigenze dell'agricoltura: abbiamo infatti possibilità nuove di correggerne i difetti e di utilizzarne i geni per l'innovazione genetica dell'agricoltura italiana.

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.

● UN'OCCASIONE DA NON PERDERE PER L'ITALIA

# Il rilancio della cerealicoltura passa anche dalle TEA

**L**a cerealicoltura è un settore strategico dell'agricoltura italiana, occupa un quarto della superficie agricola nazionale e supporta attività agroalimentari, zootecniche e industriali. Nel 2020 il frumento, l'orzo, l'avena e gli altri cereali autunno-vernini minori sono stati coltivati su 3 milioni di ettari, i due terzi dell'intera superficie cerealicola nazionale.

Con una produzione di granella di 7,9 milioni di tonnellate totali, la coltivazione italiana di cereali autunno-vernini è comunque insufficiente a soddisfare la domanda interna. Infatti, nel 2019 l'Italia ha importato 5 milioni di tonnellate di frumento tenero, 2,5 milioni di tonnellate di frumento duro e mezzo milione di tonnellate di orzo.

L'estrema variabilità climatica degli ultimi anni ha condizionato le rese medie della produzione cerealicola nazionale, che mostra una preoccupante stagnazione, come evidenziato per l'orzo nel grafico 1.

Anche le quotazioni sono basse da anni, soprattutto a causa dell'elevata offerta mondiale che è in grado di soddisfare la crescente domanda di cereali. In un mondo sempre più competitivo, **il futuro della cerealicoltura italiana dipende dall'introduzione di**

**Nel miglioramento genetico dei cereali le TEA possono risultare decisive per migliorare la produttività, la resistenza agli stress ambientali e ai patogeni e per migliorare la qualità delle produzioni**

**varietà più produttive e sostenibili, più resistenti ai patogeni e agli effetti dei cambiamenti climatici, coltivabili con meno input e quindi a costi minori e che permettano una differenziazione qualitativa delle produzioni per aumentarne la redditività.**

In questo senso, l'innovazione varietale non è solo un esercizio volto al futuro, ma è indispensabile anche solo per mantenere l'attuale competitività della cerealicoltura italiana. Se il miglioramento genetico delle varietà italiane avanzerà con ritmi inferiori a quelli degli altri Paesi, la cerealicoltura nazionale perderà sempre più terreno, fino a rendere inefficace la promozione di un prodotto made in Italy meno produttivo e più costoso.

L'Italia, che nel secolo scorso era all'avanguardia nel miglioramento genetico delle specie cerealicole grazie alle grandi innovazioni introdotte da Nazareno Strampelli con le sue sementi elette, negli ultimi decenni ha perso

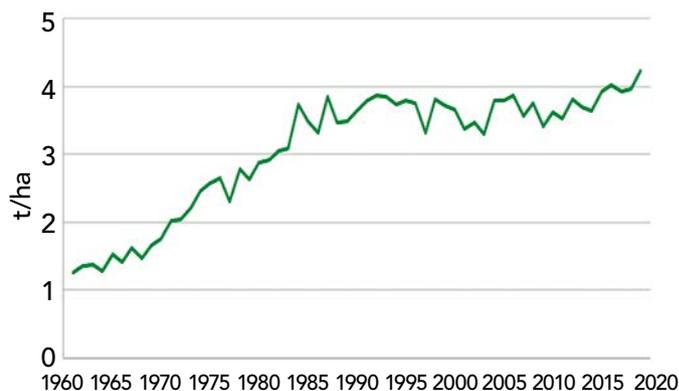
questo primato a favore di altri Paesi che hanno saputo innovare e produrre nuove varietà a fronte di ingenti investimenti pubblici e privati.

In Italia il trasferimento delle conoscenze genetiche dal sistema di ricerca pubblico all'industria privata non è stato perseguito adeguatamente e le industrie sementiere nazionali sono rimaste troppo piccole per poter sostenere grandi investimenti in ricerca. La perdita di competitività del settore sementiero nazionale è evidente dal sopravvento delle varietà estere di frumento tenero rispetto a quelle nostrane registrato negli ultimi anni (grafico 2).

Ciò è accaduto nonostante la ricerca italiana sia un'eccellenza internazionale: basti pensare al ruolo determinante giocato da ricercatori e ricercatrici italiani/e nella caratterizzazione del genoma di frumento tenero e duro e di orzo. Gli studi genetici e la rivoluzione genomica stanno fornendo le



**GRAFICO 1 - Rese medie dell'orzo in Italia dal 1960 al 2019**



Fonte: dati Faostat.

conoscenze fondamentali per identificare geni che governano i caratteri di interesse agronomico, studiarne la loro variabilità naturale e indotta e saggiare sperimentalmente le loro funzioni (foto 1). Ci sono quindi tutte le premesse per poter adottare in modo efficace le nuove Tecnologie di Evoluzione Assistita.

## Obiettivi e soluzioni

Gli obiettivi principali del miglioramento genetico per i cereali autunno-vernini sono:

- l'aumento della potenzialità produttiva senza aumento di input chimici;
- la stabilità delle produzioni attraverso una maggiore resistenza agli stress;
- il miglioramento della qualità nutrizionale e di trasformazione dei prodotti.

In Italia la ricerca sull'applicazione delle TEA per contribuire a raggiungere questi obiettivi è molto attiva e di livello internazionale. La maggior parte degli esempi riportati nei paragrafi successivi fanno riferimento a risultati ottenuti da gruppi di ricerca italiani, da soli o in collaborazione con centri di ricerca stranieri.

## TEA per aumentare la produttività

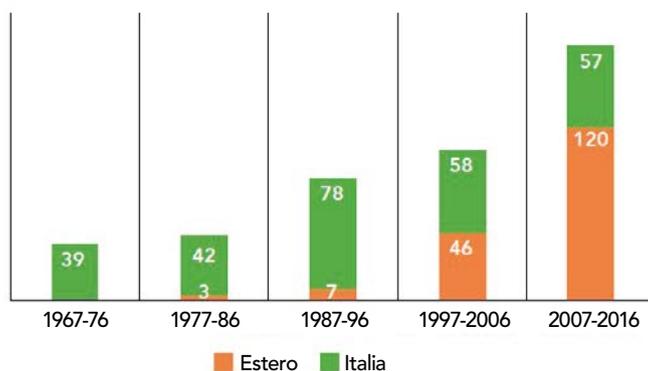
Se chiedete a un breeder per quale carattere seleziona principalmente i suoi materiali genetici, o a un agricoltore cosa vuole ottenere dai suoi campi di frumento, entrambi risponderanno: alta produzione. La potenzialità produttiva è da sempre l'obiettivo principale del miglioramento genetico dei cereali.

Il successo della Rivoluzione verde degli anni 60 è in gran parte dovuto all'introduzione di mutazioni che riducono la taglia e con essa i danni da allettamento, ma soprattutto accrescono le rese aumentando il rapporto tra granella e biomassa totale.

Le varietà moderne di cereali devono buona parte del loro successo a una migliore relazione tra assorbimento e fotosintesi e tra trasporto e accumulo dei fotosintati nei semi. Un carattere che l'applicazione delle TEA potrebbe migliorare sensibilmente è la dimensione del seme. Risultati incoraggianti sono stati realizzati in orzo e frumento (foto 2).

Un altro carattere con ottime pro-

**GRAFICO 2 - Numero di iscrizioni al Registro nazionale delle varietà di frumento tenero tra il 1967 e il 2016**



Fonte: dati Assosementi.

spettive di miglioramento attraverso le TEA riguarda l'aumento del numero di semi per spiga, mediante il controllo di geni che regolano l'accumulo di citochinine, ormoni che stimolano la divisione cellulare, e di geni che regolano lo sviluppo del primordio della spiga, come si può notare dalla foto 3.

Un aumento della produzione di biomassa totale e di granella potrebbe passare anche per un miglioramento dell'efficienza fotosintetica dei cereali, argomento che è già stato trattato in un articolo su *L'Informatore Agrario* (n. 15/2021, pag. 41).

## TEA per migliorare la resistenza ai patogeni

Molto promettenti sono i risultati ottenuti nell'applicazione delle TEA per migliorare la resistenza a malattie in diverse specie, inclusi i cereali autunno-vernini. Frumenti e orzo sono soggetti a numerose malattie, specialmente fungine e virali, che sono un importante fattore limitante sia sotto l'aspetto quantitativo sia qualitativo (foto 4).

Il controllo di malattie tramite resistenze genetiche, molte delle quali sono oggi note grazie alla genomica, è

fondamentale per un'agricoltura sostenibile che riduca drasticamente l'impiego di fitofarmaci. Esempio in questo senso è l'ampio utilizzo che si fa da oltre 40 anni della mutazione spontanea del gene di resistenza *Mlo* in orzo, originatasi in una popolazione etiope e da lì introdotta in varietà di orzo coltivate in tutto il mondo.

Le TEA possono affiancare e accelerare i metodi classici di introgressione di fonti genetiche di resistenza e migliorare la risposta dei frumenti e dell'orzo ai principali patogeni. Già nel 2014 le TEA hanno permesso l'inattivazione simultanea delle sei copie di geni di suscetti-



**Foto 1** Lo studio della diversità genetica naturale e indotta permette di identificare geni responsabili di caratteri da migliorare



**Foto 2** Incremento della dimensione del seme in una linea di orzo prodotta tramite TEA (in **alto**) rispetto alla linea originale (in **basso**) (foto CREA)

bilità *Mlo* presenti nel frumento tenero, rendendolo resistente all'oidio.

Si sta inoltre sperimentando il **trasferimento del gene di resistenza alle ruggini *Lr67*, identificato sul genoma D del frumento tenero, in varietà di frumento duro** altamente produttive ma suscettibili al fungo con approcci di cisgenesi.

## TEA per migliorare la tolleranza agli stress ambientali

Le basi molecolari e fisiologiche dei meccanismi di risposta delle piante agli stress abiotici, quali basse/alte temperature, siccità, eccesso di sale o carenza di nutrienti nel suolo, sono molto complessi e ancora non completamente chiariti. Questa carenza di conoscenze non solo è alla base degli scarsi risultati del miglioramento genetico tradizionale, ma rende problematica anche l'applicazione efficace delle TEA.

Tuttavia, alcuni geni chiave sono stati identificati in orzo e frumento ed essi rappresentano bersagli ideali delle TEA per aumentare la resilienza delle piante in ottica dei cambiamenti climatici già in atto. Un esempio interessante è rappresentato dagli studi condotti per **ottenere piante di orzo e di frumento duro più tolleranti alla siccità producendo linee con radici più profonde**.

## TEA per migliorare la qualità

Il successo del frumento è dovuto alle proprietà visco-elastiche degli impasti derivanti dalle sue farine, e in par-



**Foto 3** Confronto tra spiga non modificata (in **alto**) e spiga con aumento del numero di fiori e conseguentemente di semi in frumento duro (in **basso**)  
(foto Università di Bologna)



**Foto 4** Sintomi di oidio su frumento

ticolare alla composizione della frazione proteica. Di conseguenza, uno dei principali obiettivi del miglioramento genetico del frumento, in particolare quello duro, ha da sempre riguardato l'aumento del contenuto proteico della granella.

Inattivando in modo mirato tramite TEA i geni *Fd-GOGAT*, coinvolti nel metabolismo dell'azoto, si sta cercando di **ottenere frumenti duri con aumentato contenuto di proteine di riserva nel seme e migliorate proprietà per la trasformazione**. Le TEA possono essere usate anche per modulare la struttura dell'amido con l'obiettivo di ridurre l'indice glicemico delle farine e dei prodotti derivati, nonché di aumentarne il contenuto in fibre.

Negli ultimi anni c'è stato un aumento dell'incidenza della celiachia e di altri disturbi legati ai prodotti derivanti dal frumento. Questi disturbi sono spesso causati da fattori eterogenei, quali inibitori delle  $\alpha$ -amilasi e della tripsina (ATI), proteine LTP e glutine, in particolare gliadine. Il miglioramento varietale per queste caratteristiche nel rispetto della qualità per l'industria è stato fino a oggi fortemente ostacolato dal fatto che questi caratteri sono controllati da complessi meccanismi molecolari (fino a 100 geni per le sole  $\alpha$ -gliadine) che sono difficilmente modulabili mediante i metodi classici del breeding.

**Un vantaggio delle TEA è invece quello di poter modificare simultaneamente più geni simili tra loro**. Tramite questa tecnologia, 35 geni delle  $\alpha$ -gliadine sono stati simultaneamente inattivati in frumento tenero, riducendone l'immuno-reattività dell'85%. Risultati molto promettenti sono stati ottenuti utilizzando le TEA per inattivare due geni ATI nella varietà di frumento duro Svevo, riducendo la quantità di potenziali allergeni.

## Che cosa manca?

Da quanto scritto finora è evidente come l'applicazione delle TEA consenta di immaginare nuovi modelli di piante che abbiano una maggiore fertilità e produttività, un migliore apparato fotosintetico, caratteristiche nutritive e di trasformazione migliori e capacità elevate di rispondere alle sfide poste dall'ambiente. Tutte caratteristiche ottenibili in modo sostenibile, senza aumentare la richiesta di input chimici.

Rimangono tuttavia degli aspetti che richiedono approfondimento. Innanzitutto la difficoltà di rigenerazione *in vitro* dei cereali al momento limita l'applicazione diretta delle TEA a poche varietà. Questo problema è stato recentemente superato nell'orzo grazie a una metodica basata sulla coltura di antere.

Inoltre, un gene in grado di aumentare l'efficienza di rigenerazione *in vitro* del frumento è stato recentemente identificato e accoppiato agli approcci TEA, e non è azzardato pensare che anche la capacità rigenerativa stessa possa essere controllata con efficienza. Rimane invece ancora molta ricerca da fare per identificare i bersagli molecolari per migliorare la risposta dei cereali agli stress abiotici.

Nel prossimo decennio la combinazione di informazioni genomiche, analisi fenotipiche sempre più fini e approcci di mappatura dei geni e dei loro elementi di regolazione colmeranno molte delle lacune di conoscenza che abbiamo ora e non ci sono dubbi che le TEA diventeranno un elemento fondamentale del sistema di miglioramento genetico, determinando un'accelerazione dell'innovazione varietale.

Se il Paese sarà capace di sfruttare questi nuovi strumenti, combinandoli alle conoscenze pregresse, sarà possibile rendere più competitivo il sistema sementiero e la cerealicoltura nazionale riportando l'Italia a un ruolo leader nell'innovazione nei cereali. ●

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.

● PRODUTTIVITÀ, QUALITÀ DELL'AMIDO, RESISTENZA A STRESS ABIOTICI E MALATTIE

# Mais e riso più competitivi grazie alle TEA

**L**e coltivazioni di mais e riso sono basate, almeno nei Paesi occidentali, su metodi intensivi, richiedendo elevate quantità di fertilizzanti, in particolare azotati e l'applicazione di fitofarmaci per il controllo di infestanti, insetti (ad esempio piralide e diabrotica, in mais) o malattie (ad esempio brusone ed elmintosporiosi, in riso).

Sia mais sia riso richiedono inoltre grandi quantità di acqua per il completamento del loro ciclo colturale. Proprio in queste due specie è quindi particolarmente importante l'introduzione di sistemi innovativi rivolti al miglioramento della sostenibilità, in un contesto che è spesso definito di «intensificazione sostenibile».

Per le loro potenzialità, le TEA sono fondamentali, assieme ad altre strategie agronomiche quali l'agricoltura di precisione, per raggiungere tali obiettivi.

## Andamenti contrastanti di superfici e rese

**Il mais.** È una delle principali colture agrarie italiane, con poco più di 630.000 ha e una produzione di 6,3 milioni di tonnellate di granella. La produzione sta diminuendo drasticamente (-37% negli ultimi 15 anni) a causa di una riduzione delle superfici coltivate. La richiesta da parte dell'industria, prevalentemente mangimistica, nello stesso periodo è invece aumentata.

Ciò riduce la capacità di autoapprovvigionamento sia della grande industria (si stima che oggi sia pari al 50%), sia delle produzioni italiane alimentari di eccellenza, spesso vincolate da disciplinari di produzione che regolano l'origine delle materie prime. Il trend di incremento della resa negli ultimi 60 anni è stato invece fenomenale (circa 120 kg/ha per anno, *grafico 1*), anche grazie alle peculiari caratteristiche genetiche della specie, portando a triplicare i valori e raggiungendo oggi circa 10 t/ha.

Le coltivazioni di mais e riso soffrono da decenni di problematiche legate ad attacchi di parassiti e caratteristiche qualitative non sempre rispondenti alle richieste del mercato, tanto da causarne, nel caso del mais, importanti cali delle superfici investite. Attività sperimentali hanno dimostrato che con le TEA tali criticità sono state superate

Verifiche sperimentali hanno mostrato che oltre il 50% di tale incremento è dovuto al miglioramento genetico, mentre il cambiamento delle tecniche agronomiche ha contribuito al resto. I principali obiettivi del miglioramento genetico rimangono l'aumento della produttività, della tolleranza allo stress idrico e della resistenza a parassiti e patogeni, l'adattamento all'ambiente di coltivazione, agendo su epoche di fioritura e maturazione e sulla tolleranza al freddo primaverile.

**Il riso.** È coltivato su circa 220.000 ha, per una produzione pari a 1,5 milioni di tonnellate di granella, e tali valori non sono cambiati significativamente negli ultimi 20 anni.

L'Italia è leader in Europa con circa il 50% della produzione. La coltivazione è concentrata (>90%) in Lombardia e Piemonte. A differenza del mais, il riso non ha visto un particolare trend di incremento della resa negli ultimi 60 anni, pur tuttavia la resa è aumentata dalle circa 5 t/ha registrate in media nel decennio 1961-1970 a poco meno delle odierne 7 t/ha (*grafico 1*).

Il panorama varietale è piuttosto ristretto. Nel 2020, ad esempio, il 73% della superficie risicola italiana è stata coltivata con solo 20 delle 234 varietà iscritte al Registro nazionale (dati CREA-DC).

Gli obiettivi del miglioramento genetico del riso sono stati, e rimangono, l'incremento della capacità produttiva, la resistenza alle malattie, la riduzione del ciclo colturale e della taglia e, più recentemente, gli aspetti merceologici e qualitativi del prodotto e la lotta al riso crodo.

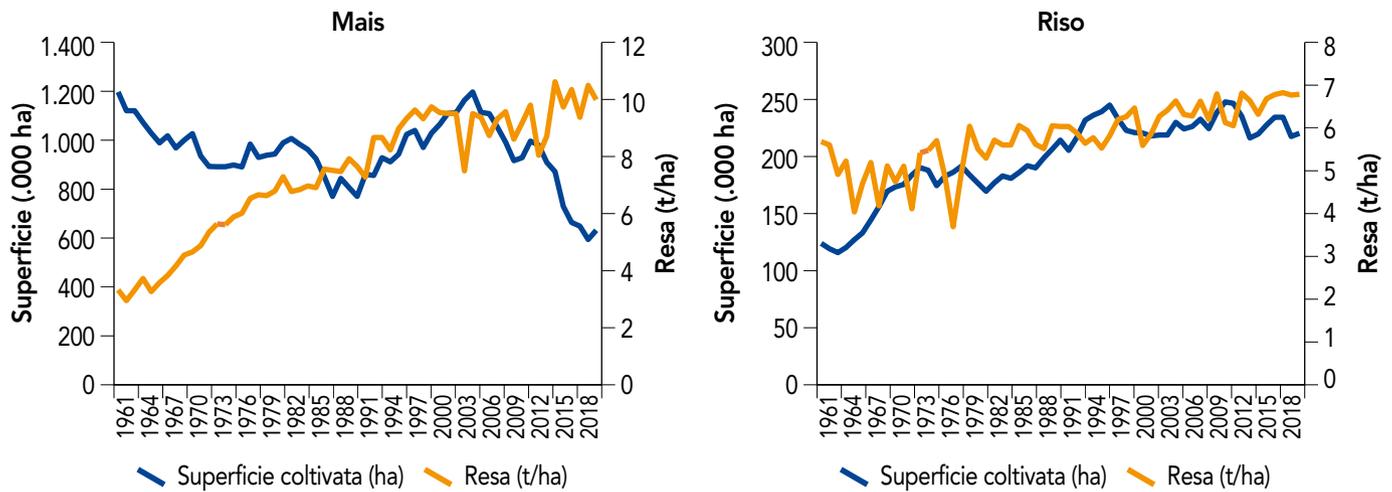
## Primo obiettivo: più produttività

Sia in mais sia in riso, un promettente settore di intervento delle TEA è quello dell'incremento del potenziale produttivo, agendo sulle componenti morfofisiologiche della pianta che determinano la produzione (ad esempio numero di ranghi per spiga/rami pannocchia, o il peso medio del seme).



**Foto 1** Confronto tra spiga di mais non migliorato (a sinistra) e spiga ottenuta da mais migliorato agendo sui geni FEA e CLE (a destra)

**GRAFICO 1 - Superfici e resa in granello per ettaro di mais e riso in Italia (1961 - 2019)**



Fonte: Faostat.

**Mais.** Si è compreso che modificando l'espressione di alcuni geni che determinano il numero di ranghi della spiga, ad esempio i geni *FEA* e *CLE* che controllano lo sviluppo dei meristemi, tessuti di cellule indifferenziate in grado di dividersi, è possibile aumentare il numero di semi per pianta (foto 1), senza ripercussioni negative su altre caratteristiche. Tali geni sono ora disponibili per applicazioni TEA.

**Riso.** Sono stati scoperti geni che controllano il numero di ramificazioni della pannocchia (ad esempio il gene *IPA1*), il numero di fiori e semi per ramificazione (*Gn1a* e *DEP1*) e le dimensioni dei semi (geni *GS3*, *GW2* o *GS5*). La modifica mirata di ciascuno di questi geni con le TEA ha prodotto miglioramenti anche del 50%. Il *pyramiding*, ovvero lo spostamento e la concentrazione nelle varietà coltivate, di questi alleli positivi ha una grande potenzialità di miglioramento della resa.

## Contrastare gli stress abiotici e biotici

**Mais.** Migliorare la tolleranza allo stress idrico e l'efficienza d'uso dell'acqua è da sempre uno dei principali obiettivi del miglioramento genetico in mais. Tale importanza è addirittura aumentata nell'attuale contesto di crisi climatica. Alcune delle principali aziende sementiere hanno sviluppato e stanno già offrendo sul mercato ibridi migliorati in questa direzione (DroughtGard, di Bayer; Aquamax, di Corteva; Agrisure Artesian, di Syngenta). Lo sviluppo di questi ibridi è avve-

nuto tramite incrocio e selezione supportati dalla genomica, oppure tramite ingegneria genetica (ovviamente non per il mercato europeo).

Un recente passo in avanti in questo ambito è scaturito dalla comprensione che una carenza idrica, anche di modesta intensità, induce una sovrapproduzione di etilene (uno dei principali ormoni delle piante), che a sua volta sopprime la crescita della pianta. Tale reazione è spesso spropositata e può ridurre la produzione. Sulla base di queste conoscenze, alcuni ricercatori hanno identificato uno dei geni coinvolti (il gene *Argos*) e ne hanno modificato l'espressione tramite TEA, an-

nullando gli effetti negativi.

Da notare che, grazie all'applicazione delle TEA, non sono state modificate le sequenze codificanti di nessun gene, né sono stati inseriti tratti di DNA provenienti da altre specie.

**Riso.** Nel riso gli sforzi si sono concentrati soprattutto sulla tolleranza alle malattie. Una delle principali, di origine fungina, è il brusone, il cui agente causale è l'ascomicete *Pyricularia grisea*.

In Italia è responsabile di perdite di produzione tra il 7 e il 40%. Si noti che furono proprio le epidemie di brusone all'inizio del secolo scorso a stimolare l'attività di miglioramento genetico del riso nel nostro Paese.

La gravità degli attacchi del brusone dipende dalle condizioni climatiche, e da altri fattori predisponenti quali la suscettibilità genetica della varietà, l'eccesso di azoto, ecc.

Sono già numerosi gli esempi disponibili in cui la mutazione mirata di geni tramite TEA ha consentito di migliorare la tolleranza al brusone. Un esempio significativo riguarda il gene *Pi21*, il cui allele favorevole, originato da mutazione spontanea della sua sequenza, da varietà giapponesi, induce resistenza durevole ai ceppi più diffusi di brusone.

Il gene è di difficile utilizzo nel miglioramento genetico tradizionale in quanto si trova concatenato sullo stesso cromosoma con un gene che conferisce pessime caratteristiche qualitative. Le TEA sono particolarmente indicate per risolvere questo problema, potendo introdurre, in modo mirato, mutazioni in *Pi21*, direttamente nelle



**Foto 2** Esempio di risultati ottenuti tramite editing di un gene coinvolto nella risposta della pianta a *Pyricularia grisea*, agente del brusone: a **sinistra** la forma non migliorata e a **destra** quella migliorata



linee o cultivar di interesse (foto 2). Altri studi basati su TEA hanno mostrato di poter sviluppare cultivar resistenti alle batteriosi causate da *Xanthomonas oryzae*, particolarmente diffuse in Asia.

### Migliorare la qualità

La qualità dell'amido, e in particolare il rapporto quantitativo tra le sue componenti, amilosio e amilopectina, è stato oggetto delle prime applicazioni TEA sia in mais sia in riso.

**Mais.** Varietà di mais che producono solo amilopectina o solo amilosio sono di interesse per l'industria chimica, della carta e alimentare. In mais esistono da decenni ibridi waxy che, grazie a mutazioni naturali del gene *Wx*, producono quasi esclusivamente amilopectina; tuttavia tali ibridi hanno una resa in granella inferiore rispetto ai corrispettivi non-waxy. Tramite applicazioni TEA, il gene *Wx* è stato inattivato in maniera mirata direttamente nei materiali vegetali più produttivi, annullando la differenza di resa. Grazie alle TEA, lo sviluppo di questi nuovi ibridi è stato estremamente rapido.

**Riso.** Il rapporto fra amilosio e amilopectina influenza le proprietà di consistenza e tenuta alla cottura del riso. È inoltre un parametro importante da considerare se il prodotto è destinato a pre-cottura o parboilizzazione. La riduzione del contenuto di amilosio tramite TEA è stata ottenuta per mutazione mirata del gene *Wx*, o dei geni *SBE*.

In maniera analoga, grazie al pro-

gredire delle conoscenze sul controllo genetico della produzione di molecole aromatiche (per esempio 2-acetil 1-pirrolina, responsabile della fragranza) è stato possibile convertire varietà non aromatiche in aromatiche, introducendo mutazioni mirate nel gene *BA-DH2*, un processo che avrebbe richiesto molti anni di lavoro se svolto tramite breeding tradizionale.

### Miglioramento genetico del seme

Oltre che di interesse per l'agricoltore, l'industria di trasformazione e il consumatore, le applicazioni TEA possono avere un impatto importante sull'industria sementiera.

La modifica tramite TEA di geni specifici può infatti velocizzare lo sviluppo di cultivar di tipo ibrido F1, facilitando l'utilizzo degli aploidi raddoppiati, o DH (dall'inglese doubled haploids) e della maschiosterilità. Al riguardo è doveroso ricordare che quest'anno è scomparso Yuan Longping, il genetista che per primo ha costituito il riso ibrido, partendo da parentali maschiosterili che aveva individuato nel 1964, cercandoli tra chilometri di risaie.

Le sue ricerche hanno dato il via alla coltivazione di riso ibrido che ora sostiene circa il 50% della produzione cinese. Tuttavia, in Europa l'introduzione del riso ibrido è ostacolata dall'elevato costo di produzione del seme, che supera i vantaggi dell'incremento di resa fornito dal fenomeno dell'eterosi. Una delle strategie per estendere

l'utilizzo di cultivar ibride, nella direzione di una maggiore intensificazione sostenibile, è quello di utilizzare le TEA per fissare il vigore fornito dall'eterosi, inducendo la produzione di seme apomittico, cioè che non richiede il processo di fecondazione, dalla pianta F1, in questo modo mantenendone e perpetuandone nelle successive generazioni le caratteristiche di vigore.

Nel 2019 un gruppo di ricerca cinese ha dimostrato che l'editing genomico simultaneo di quattro geni in piante ibride consentiva la fissazione del genotipo ibrido nei semi da esse derivati. L'applicazione commerciale non è immediata, ma lo studio dimostra che è possibile fissare e propagare il vigore dell'ibrido via seme. Si tratta ora di aumentarne l'efficienza.

### In definitiva

Da quanto riportato sopra emerge, per due colture importanti per l'Italia come mais e riso, un quadro grandemente favorevole all'impiego delle TEA come strumenti per affrontare efficacemente e velocemente alcuni dei problemi che attanagliano la maiscoltura e la risicoltura italiana da decenni. ●

*La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.*

● L'INNOVAZIONE PER SODDISFARE I MERCATI E FRONTEGGIARE IL CLIMA CHE CAMBIA

# Culture orticole: le TEA per rispondere ai cambiamenti

«L'agricoltura fornisce proteine, fornisce carboidrati, fornisce gli alimenti di base, ma avremmo una vita piuttosto noiosa senza l'orticoltura. L'orticoltura dà colore, l'orticoltura ci dà i sapori, ci dà tutti i benefici per la salute di una dieta equilibrata». Questa frase di Roderick A. Drew, ex presidente della International Society for Horticultural Science, riassume bene caratteristiche e potenzialità delle specie orticole che hanno un accertato effetto positivo sulla salute, al punto che la FAO ha dedicato il 2021, l'anno successivo alla pandemia di Covid-19, alla frutta e alla verdura.

Infatti, secondo dati preoccupanti pubblicati nel 2019 dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), nell'anno 2017 quasi 4 milioni di decessi sono da attribuire allo scarso consumo di questi prodotti. Quindi, per la FAO e l'OMS, all'attuale pandemia di Covid-19 si aggiunge una «pandemia» di malattie non trasmissibili, molte delle quali causate proprio da una cattiva alimentazione intesa sia in quantità, sia in qualità.

Una maggiore salute del singolo vuol dire maggiore salute dell'intera società che si traduce in un minor costo della sanità, ecco perché è necessario che tutti gli attori coinvolti nella filiera produttiva, dalla ricerca al post-raccolta, agiscano insieme per incrementare la produzione qualitativa e il consumo di ortaggi e frutta. Non secondaria è poi l'importanza di queste specie nel nostro Paese, dove alla lunga tradizione di coltivazione si associa anche quella culinaria, che nell'esaltare il prodotto spesso ne preserva le sue caratteristiche salutistiche.

## La produzione

Nell'Unione europea, le colture orticole generano circa un quarto del valore della produzione agricola comunitaria su solo il 3% della superficie destinata all'agricoltura. Le specie ortive sono un emblema del Made in Italy e sono alla base della dieta mediterranea.

Il miglioramento genetico è essenziale in un comparto come quello delle orticole che deve rispondere con prontezza sia alle mutate situazioni agronomiche sia alle nuove richieste dei consumatori e quindi del mercato

Secondo gli ultimi dati ISTAT, nel nostro Paese l'ortofrutta rappresenta il 30% del valore economico dell'agricoltura nazionale, mentre le esportazioni superano le importazioni per 1,4 miliardi di euro. Nel 2020 la superficie coltivata a ortaggi in Italia è stata poco superiore a 357.000 ettari, equivalente a poco più del 2,6% sul totale della SAU, per una produzione di 12,7 milioni di tonnellate e un valore di 8 miliardi di euro (grafico 1).

Il comparto è andato crescendo negli anni e anche durante la pandemia ha registrato un aumento percentuale in valore pari al 3,1%. Rispetto agli altri comparti, e assieme a quello floricolo, ha il più alto valore del rapporto Produzione lorda vendibile per ettaro, da 7 volte maggiore rispetto al comparto frutticolo a 21 volte rispetto a quello cerealicolo.

Le colture orticole si basano su un'ampia variabilità in termini di specie, modalità di coltivazione, prodotti e usi, che vanno sempre più aumentando nei mercati più evoluti e che necessita-

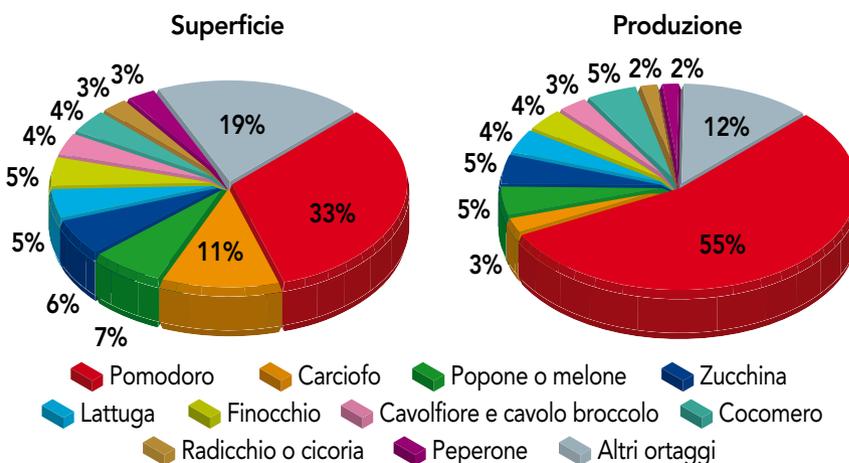
no, per una produzione sostenibile, di diverse pratiche e di tecnologie adattate ai contesti locali.

Esse si coltivano all'aperto in pieno campo o in coltura protetta e anche senza suolo. I prodotti quali foglie, frutti, radici, fiori, semi, si commercializzano e consumano crudi o cotti, da soli o insieme ad altri tipi di alimenti, freschi, secchi, inscatolati, surgelati, lavati e imbustati, sotto forma di spremute.

Alle diverse specie del comparto afferiscono numerosissime varietà ed ecotipi locali, con diverse e specifiche esigenze nei riguardi delle diverse fasi della coltivazione, dalla semina/trapianto alle lavorazioni, dalle necessità energetiche alla difesa dalle condizioni ambientali e dai parassiti, dalle diverse tecniche di raccolta a quelle della fase di post-raccolta, ma sono unite dalla limitata serbevolezza e dalla media-alta intensività colturale.

Un esempio di orticoltura «super-intensiva» è oggi rappresentato dagli im-

**GRAFICO 1 - Superficie (%) coltivata a ortaggi e produzione totale (%) in Italia nel 2020 delle 10 principali specie**



**TABELLA 1 - Esempi di caratteri di interesse agronomico o relativi alla qualità dei prodotti modificati con le TEA in alcune specie coltivate**

Caratteri	Specie coltivate	Geni modificati
<b>Resistenza a parassiti</b>		
Oidio	Pomodoro	<i>MLO, PMR4</i>
Peronospora	Pomodoro	<i>DMR6</i>
Picchiatura batterica	Pomodoro	<i>JAZ2</i>
Virosi dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro	Pomodoro	<i>Ty-5/SIPelo</i>
Orobanche del pomodoro	Pomodoro	<i>ccd7, ccd8</i>
Varie virosi	Cetriolo	<i>eIF4E</i>
Peronospora	Basilico	<i>DMR6, HSK</i>
<b>Tolleranza a stress ambientali</b>		
Siccità	Pomodoro	<i>LBD40</i>
Salinità	Pomodoro	<i>HyPRP1, P5CDH</i>
<b>Qualità dei frutti</b>		
Contenuto di carotenoidi	Pomodoro	<i>SGR1, LCY-E, LCY-B1, LCY-B2, Blc, Psy1, CycB, CRTISO</i>
Contenuto di flavonoidi nell'epidermide	Pomodoro	<i>Myb12</i>
Contenuto di acido γ-aminobutirrico	Pomodoro	<i>GAD2, GAD3, GABA-TP1, GABA-TP2, GABA-TP3, CAT9, SSADH</i>
Maturazione e conservabilità	Pomodoro	<i>RIN, NOR-like1, SBP-CNR, NAC-NOR, AP2a, FUL1/TDR4, FUL2/MBP7, PL, PG2a, TBG4</i>
Partenocarpia	Pomodoro	<i>IAA9, AGL6</i>
Contenuto di vitamina C	Pomodoro	<i>GGP</i>
Contenuto di glicocalcoidi	Pomodoro	<i>GAME4</i>
Contenuto di allergeni	Pomodoro	<i>SOLA4</i>
Contenuto di solidi solubili	Pomodoro	<i>LIN5</i>
Imbrunimento	Melanzana	<i>PPO4, PPO5, PPO6</i>

pianti di *vertical farming* in costruzione nel mondo, soprattutto per le specie a foglia. Il comparto è, inoltre, caratterizzato dall'elevato numero di prodotti registrati come bio e DOP.

## Tante problematiche da affrontare

I cambiamenti climatici stanno determinando veloci cambiamenti nell'intensità e diffusione degli stress ambientali e di quelli dovuti a vecchi e nuovi parassiti. Per quest'ultimo aspetto è emblematico il caso della *Tuta absoluta*, la tignola del pomodoro, che è arrivata in Europa nel 2006 e in Italia nel 2008 dagli ambienti tropicali del Sud-America, ben insediandosi in quelli mediterranei e provocando danni a diverse specie, ma soprattutto al pomodoro.

È quindi fondamentale disporre di tecnologie adeguate per sviluppare ve-

locemente genotipi con alti livelli di tolleranza agli stress e dotati di fattori di resistenza duraturi. La sostenibilità dei processi produttivi in un'ottica di intensificazione sostenibile (*more with less*) è anche un obiettivo molto importante in tutte le specie ortive, che sono colture ad alta intensività d'uso dei fattori produttivi. Questo si deve tradurre nella selezione di genotipi che portino alla riduzione degli input e al miglioramento dell'efficienza d'uso di energia, acqua, fertilizzanti e prodotti chimici, nonché delle risorse suolo e lavoro.

Per quanto riguarda gli aspetti qualitativi e le sempre più diversificate richieste dei consumatori, è necessario sviluppare genotipi che garantiscano prodotti innovativi, caratterizzati da alto contenuto di servizio, alto valore nutrizionale e salutistico, elevato livello di sicurezza alimentare, sia alla raccolta che dopo la conservazione e il trasporto.

## Piante ortive e TEA

Le TEA sono uno strumento molto potente di miglioramento genetico anche per le specie ortive, considerando le molteplici utilizzazioni di ogni specie, la frammentazione dei mercati e delle richieste da parte dei consumatori, la necessità di sviluppare velocemente innovazioni di prodotto e di fronteggiare le conseguenze dei cambiamenti climatici.

Il miglioramento genetico classico non riesce sempre a produrre nuove varietà in grado di fronteggiare i rapidi cambiamenti indotti da mutate esigenze agronomiche, dalle richieste dei consumatori verso prodotti con nuove caratteristiche nutrizionali e/o organolettiche e da stress ambientali e da parassiti.

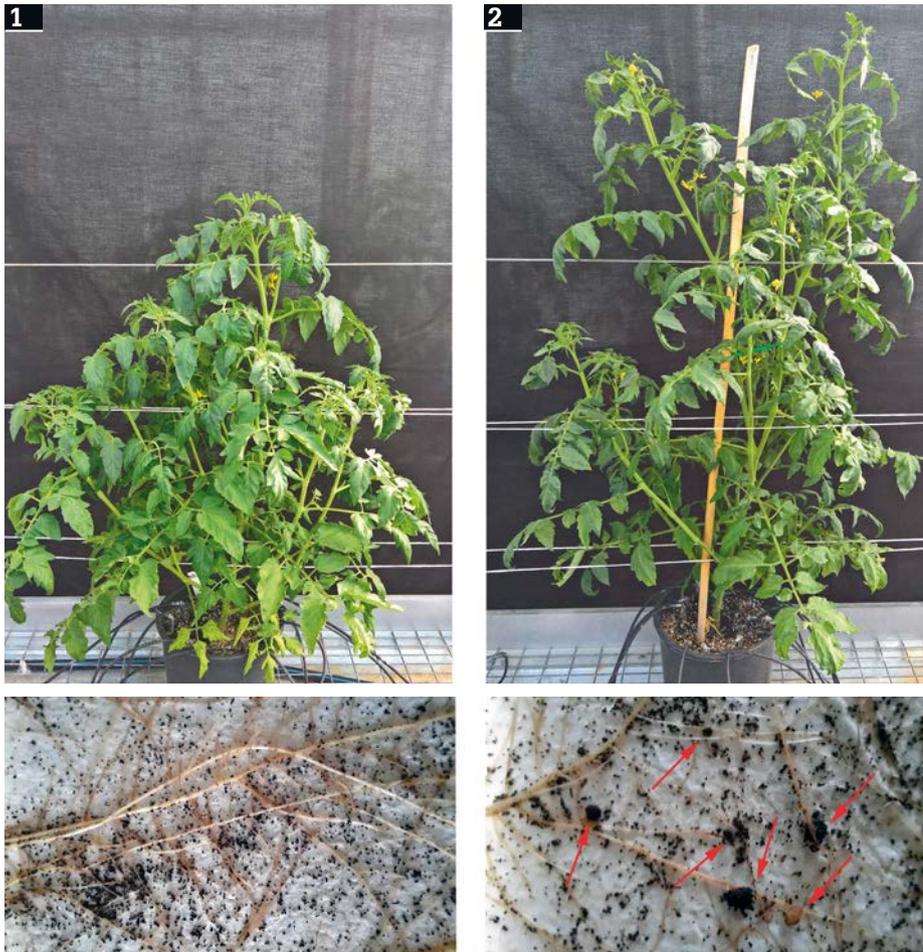
Nel settore ortivo, esempi di applicazione delle TEA sono riportati in basilico, cavolo cappuccio, cavolo cinese, carota, cetriolo, cicoria, cocomero, lattuga, melanzana, pomodoro, con oltre un centinaio di articoli pubblicati sulle diverse specie, sebbene la gran parte delle applicazioni si riferisca al pomodoro (tabella 1). Ciò non è casuale, in quanto questa specie non solo ha considerevole importanza economica in diversi Paesi, ma per essa sono disponibili conoscenze genetiche e genomiche dettagliate sul controllo dei caratteri di interesse e protocolli efficienti di rigenerazione.

## Piante più sane

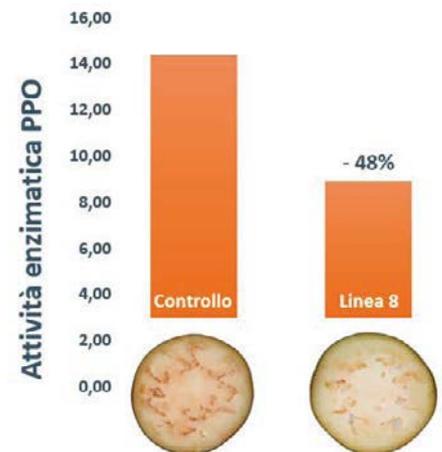
In molti casi, il controllo dei parassiti che attaccano le diverse specie ortive è particolarmente difficile non solo per la comparsa di nuove malattie a causa dei cambiamenti climatici, ma anche per la progressiva riduzione dei prodotti chimici utilizzabili, per l'estrema specializzazione dei sistemi colturali che rende difficile la sostituzione delle specie impiegate e per l'allevamento in ambiente protetto durante tutto l'anno.

La produzione di piante resistenti è viepiù necessaria nell'orticoltura biologica, dove le opportunità di controllo rapido degli attacchi parassitari sono minori, e in tutti i sistemi agricoli a basso impatto. Nel pomodoro, l'inattivazione con le TEA di due geni di «susceptibilità», necessari per l'instaurarsi della malattia, ha consentito la produzione di piante resistenti a oidio, differenti dalle piante suscettibili solo per la mutazione indotta.

Ricerche in questo campo sono attive anche in Italia per ottenere piante di pomodoro resistenti all'oidio e alla peronospora.



**FIGURA 1 - Riduzione *browning* su melanzana: analisi fenotipica e biochimica dell'imbrunimento post-taglio nella varietà Black Beauty, in una linea controllo e una linea mutante ottenuta mediante applicazione delle TEA nei geni PPO <sup>(1)</sup>**



<sup>(1)</sup> La riduzione dell'attività enzimatica delle ppo nella linea mutante è indicata in percentuale.  
(Fonte: Acquadro e Moglia, Università di Torino).

**Foto 1** Fenotipo della parte aerea e suscettibilità all'infezione radicale della pianta parassita *Phelipanche ramosa* nel mutante *ccd8* prodotto con le TEA (1) rispetto al pomodoro non mutato (2). In quest'ultimo, al contrario del mutante, sono visibili i tubercoli radicali (siti di infezione) (fonte: Alessandro Nicolai, CREA-Orticoltura e Florovivaismo)

Grazie alle conoscenze dei sofisticati meccanismi di patogenicità del batterio *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agente della picchiettatura batterica, è stato possibile impedire la penetrazione del batterio negli stomi, senza alterare la traspirazione delle piante ospiti o la loro resistenza alla botrite.

Grazie all'inattivazione di un altro gene di suscettibilità, è stata limitata la proliferazione nelle piante ospiti del TYLCV (virus dell'accartocciamento fogliare giallo del pomodoro), anch'esso un patogeno originario delle zone tropicali e sub-tropicali, trasmesso normalmente da una specie di mosca bianca (*Bemisia tabaci*), ma anche per seme, provocando una delle malattie più distruttive del pomodoro.

In Israele e nel nostro Paese sono attivi programmi per il controllo delle piante parassite quali *Phelipanche ramosa*, che attacca molte specie e in Italia provoca danni soprattutto in Puglia ed Emilia-Romagna nelle coltivazioni di pomodoro da industria.

Poiché la germinazione dei semi della specie parassita dipende dal rilascio nel terreno di particolari sostanze dette «strigolattoni» da parte della pianta ospite, con le TEA si sta tentando di inattivare i geni coinvolti nella sintesi degli strigolattoni e/o nel loro trasporto all'esterno delle radici (foto 1).

Ricerche simili sono condotte con successo anche in altre specie ortive. Per il cetriolo sono state prodotte piante resistenti a diversi virus, impedendo la produzione delle proteine virali nelle cellule ospiti, mentre per il basilico, la coltura da cui si ottiene il pesto, la salsa cruda più consumata nel mondo, sono state ottenute piante resistenti alla peronospora.

## Piante più tolleranti agli stress

La tolleranza delle piante coltivate in condizioni di carenza idrica e salinità è fondamentale per far fronte ai cambiamenti dell'ambiente e per poter usare

in maniera più efficiente e sostenibile le risorse, per esempio potendo utilizzare meno acqua o destinando all'agricoltura acqua e/o suoli con maggior contenuto di sale. Recentemente, sono stati pubblicati, anche in Italia, alcuni risultati che fanno ben sperare per il futuro: inattivando geni coinvolti nella tolleranza a stress osmotici, sono state ottenute piante più tolleranti la carenza di acqua o lo stress salino.

Man mano che si accumulano maggiori conoscenze sui geni che controllano questi caratteri complessi, le TEA possono dare un contributo risolutivo a problemi in cui il miglioramento genetico convenzionale ha incontrato delle particolari difficoltà.

## Piante più buone

Agendo con le TEA contemporaneamente su cinque geni diversi è stato possibile aumentare di cinque volte il contenuto di licopene, la sostanza responsabile del colore rosso dei frutti di pomodoro e importante per prevenire alcuni tipi di cancro.

Le TEA sono state utilizzate anche per impedire l'accumulo di alcuni flavonoidi di colore giallo nell'epidermide dei frutti, per cui questi risultano rosa, un carattere particolarmente apprezzato in Asia, ma presente anche in alcune varietà italiane, quali il pomodoro di

## TECNOLOGIE DI EVOLUZIONE ASSISTITA



San Marzano

Green flesh

Tangerine

5 cm

**Foto 2** Bacche di pomodoro tipologia San Marzano prodotte mediante TEA: al **centro** per il gene *Stay-Green*, che riproduce il fenotipo «green flesh» per il mantenimento della clorofilla, a **destra** per il gene *CrtSO*, che riproduce la mutazione «tangerine», responsabile dell'accumulo di pigmento arancione policopene. A **sinistra** bacche del pomodoro San Marzano controllo (fonte: Mazzucato e Dono, Università della Tuscia)

Sorrento, la varietà normalmente utilizzata nell'insalata caprese.

In Giappone e in Cina, grazie all'applicazione delle TEA, sono stati ottenuti pomodori con alto contenuto di acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), una sostanza normalmente presente nel pomodoro e con diverse funzioni. Consumato nella dieta, è stato dimostrato che ha un effetto positivo sull'abbassamento della pressione arteriosa nei soggetti ipertesi. La varietà «Sicilian Rouge» High GABA sarà il primo prodotto delle TEA rilasciato in Giappone.

La conservabilità è un altro carattere molto importante nel pomodoro e in molti laboratori nel mondo si stanno applicando le TEA per modificare l'espressione dei geni responsabili della maturazione.

Infine, in Giappone e Israele sono stati ottenuti pomodori in grado di produrre frutti senza fecondazione, quindi privi di semi, in situazioni non ottimali di luce e/o temperatura, senza ricorrere all'applicazione di ormoni.

In Italia, le TEA sono state applicate anche su alcuni geni che controllano la biosintesi e l'accumulo dei carotenoidi con effetti sul colore dei frutti di pomodoro e il loro valore nutrizionale (foto 2). Sempre in pomodoro, le TEA sono utilizzate per aumentare il contenuto di vitamina C o ridurre quello di sostanze antinutrizionali e allergeni.

Altri obiettivi della ricerca pubblica nazionale perseguiti tramite l'applicazione delle TEA sono l'aumento del contenuto di solidi solubili, principalmente zuccheri, responsabili del sapore e della resa industriale dei frutti, e l'accumulo nei frutti di sostanze utili dal punto di vista nutrizionale o della conservabilità.

In specie diverse dal pomodoro, risultati promettenti sono stati ottenuti

per ridurre l'imbrunimento dei frutti di melanzana, inibendo con le TEA l'espressione di tre geni responsabili dell'ossidazione dei polifenoli nei frutti quando esposti all'aria (figura 1). Un obiettivo simile lo si sta perseguendo anche sul carciofo, sebbene in questa specie sia molto più difficile rigenerare in vitro piante modificate per i caratteri d'interesse.

Nella melanzana, altri caratteri migliorabili con le TEA sono la resistenza all'avvizzimento provocato dal fungo *Fusarium* e la produzione di piante partenocarpiche. In lattuga ci si sta concentrando sull'aumento del contenuto di vitamina C nelle foglie.

### Altre applicazioni

Nelle specie ortive le TEA aprono prospettive interessanti anche per caratteri più complessi con applicazioni del tutto nuove e di più ampia portata. In pomodoro è stata dimostrata la possibilità di replicare il processo di domesticazione che dalle specie selvatiche ha portato nei secoli alle forme coltivate, processo che ha determinato, in alcuni casi, la perdita di geni e caratteri utili.

Tramite le TEA, ripercorrendo in pochi mesi un percorso di millenni, è stato possibile «addomesticare» *de novo* la specie selvatica *Solanum pimpinellifolium*, progenitrice del pomodoro coltivato, introducendo i caratteri necessari per la coltivazione, ma preservando alcuni caratteri d'interesse per quanto concerne la qualità e la resistenza a stress.

Inoltre, agendo su geni diversi, è stata modificata la dimensione dei frutti, la precocità della fioritura e l'architettura della pianta, caratteri non facilmente affrontabili con il miglioramento genetico convenzionale. È stato così pos-

sibile produrre nuovi tipi di piante di pomodoro, in alcuni casi adatti anche all'agricoltura urbana o alla coltivazione in ambienti ristretti, come le stazioni antartiche o le astronavi.

### TEA, strategia efficace sulle colture ortive

Come già accennato, le ortive sono un patrimonio di estremo valore nel panorama dell'agricoltura e dell'alimentazione italiana. Il miglioramento genetico delle ortive, finalizzato alla produzione di varietà adatte ai nostri ambienti di coltivazione e all'intensificazione sostenibile dell'orticoltura, può trarre un enorme vantaggio dalle TEA, soprattutto considerando i veloci cambiamenti imposti dalle variazioni climatiche e dall'evoluzione dei gusti dei consumatori.

Nel tempo si sono differenziate nel nostro Paese molte varietà locali che, però, pur presentando in alcuni casi caratteristiche di pregio, non riescono a tenere il passo con le moderne varietà a causa di limitazioni agronomiche e produttive, suscettibilità a molte malattie, vecchie e nuove, scarsa conservabilità e altri difetti.

In conclusione, le TEA sono una strategia molto efficace per superare molte di queste limitazioni, intervenendo in maniera chirurgica sui geni che controllano i caratteri d'interesse, lasciando inalterati tutti gli altri e sostanzialmente preservando l'ampia biodiversità disponibile e rendendo nuovamente competitive molte varietà che hanno contribuito al made in Italy e che o sono state accantonate o rischiano di esserlo a breve. ●

*Un sentito ringraziamento per il loro contributo ai colleghi e alle colleghe: Alberto Acquadro, Giorgia Batelli, Tommaso Giordani, Stefania Grillo, Marina Laura, Andrea Mazzucato, Andrea Moglia, Giorgio Morelli, Alessandro Nicolai, Claudio Pugliesi, Giuseppe Leonardo Rotino, Sara Sestili, Marco Savona, Laura Toppino, Ambra Viviani.*

*La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.*

● RESISTENZA ALLE MALATTIE, MAGGIOR PRODUTTIVITÀ, MENO FATTORI ANTINUTRIZIONALI

# Con le TEA leguminose più produttive e nutritive

**N**egli ultimi anni le leguminose da granella stanno riscuotendo un interesse crescente in Italia, in Europa e nel resto del mondo, e il 2016 è stato l'Anno internazionale dei legumi.

In Italia la produzione di legumi secchi per alimentazione umana era diminuita rapidamente a partire dagli anni 60 del 1900, passando da circa 640.000 t a meno di 150.000 negli anni 2010-2015, contemporaneamente all'aumento delle proteine di origine animale nella dieta. Negli ultimi anni la tendenza si è però invertita e **nel 2018 la produzione ha raggiunto circa 200.000 t, con un aumento dell'81% dal 2015**. Nonostante questo restiamo importatori netti (grafico 1).

I motivi di questo ritorno di interesse sono legati alle politiche di promozione delle proteine di origine vegetale attuate dall'UE, tanto che dal 2013 la produzione europea è quasi triplicata, raggiungendo 2,6 milioni di ettari e 6 milioni di tonnellate nel 2018.

Con la Pac 2014-2020 le leguminose sono state inserite tra le colture a cui possono essere concessi gli aiuti accoppiati (aiuto legato al tipo di coltivazione), gli incentivi previsti per l'applicazione del greening (pagamento ecologico) e i pagamenti agro-climatico-ambientali.

Uno dei motivi del ritorno delle leguminose nell'alimentazione è certamente la tendenza a ridurre il consumo di carni, sia per ragioni salutistiche sia per la maggiore sensibilità dei cittadini verso consumi sostenibili. I legumi sono particolarmente apprezzati perché sono una fonte di proteine (16-50% del peso secco), fibre (3-15% del peso secco), carboidrati (20-50% del peso secco) e micronutrienti, in particolare minerali essenziali, come ferro e zinco, vitamine e folati.

Il rinnovato interesse per le leguminose da granella trova una limitazione nella redditività di queste colture. Ad esempio, men-

Per le leguminose in genere, e per la soia in particolare, le attuali conoscenze genetiche consentirebbero di agire attraverso le TEA per ottenere varietà più adatte all'ambiente di coltivazione e più nutritive, disattivando i geni responsabili della sintesi dei fattori antinutrizionali

tre il valore della soia nel 2019 è oscillato tra 216 e 394 euro/t, il cece nello stesso periodo ha registrato prezzi tra 82 e 175 euro/t, con rese a ettaro molto simili.

Un'innovazione genetica che metta a disposizione degli agricoltori varietà adeguate sia per caratteristiche agronomiche sia per qualità dei prodotti può essere la chiave per favorire lo sviluppo di queste colture. **Le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) ci danno la possibilità di intervenire con modifiche mirate per il miglioramento di importanti caratteri produttivi e qualitativi delle leguminose da granella.**

## Impedire la dispersione dei semi

La tendenza del baccello delle leguminose ad aprirsi a maturità lasciando cadere i semi (deiscenza) è un carattere molto negativo per le

leguminose coltivate, perché fa perdere prodotto prima della raccolta. La domesticazione delle leguminose ha portato alla selezione di varietà indeiscenti, ma questa caratteristica genetica non è presente in tutte le leguminose coltivate e può inoltre venire persa durante programmi di miglioramento genetico che utilizzano l'incrocio con specie selvatiche (utili per introdurre resistenza a stress o a patogeni, o altri caratteri importanti).

La deiscenza/indeiscenza deriva dalla lignificazione di particolari cellule e tessuti durante lo sviluppo del baccello e può dipendere da diversi geni. La ricerca ha permesso di identificare mutazioni che fanno perdere la deiscenza. Un esempio è quello del gene PDH1 di soia che controlla l'accumulo di lignina, in cui il cambiamento di una sola lettera del codice genetico elimina la deiscenza. **Le TEA possono riprodurre queste mutazioni puntiformi introducendo la resistenza**

**alla deiscenza in diverse specie e varietà di leguminose da granella senza modificare gli altri caratteri della pianta.**

## Fioritura «temporizzata»

La possibilità di modificare il momento della fioritura permette alle piante di adattare la riproduzione a specifiche condizioni di luce e temperatura o di rispondere a condizioni di stress ambientale. Inoltre, una fioritura e maturazione sincrona, tale che tutte le piante del



Foto 1 Embrioni somatici di *Medicago sativa* rigenerati *in vitro*

campo fioriscano e maturino insieme, è essenziale per la raccolta meccanizzata. La disponibilità di varietà precoci o tardive permette agli agricoltori di differenziare i tempi di raccolta; la possibilità di adattare il tempo di fioritura permette di coltivare varietà di pregio in diverse parti del mondo che presentano condizioni ambientali molto varie.

Il controllo genetico del tempo di fioritura e maturazione è molto complesso, ma si conoscono molti dei geni chiave. Anche in questo caso **le TEA possono riprodurre delle mutazioni puntiformi per adattare il tempo di fioritura all'ambiente di coltivazione**, in modo che sia meno sensibile ai cambiamenti climatici repentini a cui stiamo assistendo. Ad esempio, sono state già ottenute piante di soia con fioritura ritardata intervenendo sul gene GmFT2a. È noto che mutazioni dei geni di soia GmE2 e GmE3 hanno reso la fioritura meno sensibile al fotoperiodo, permettendone la coltivazione a latitudini diverse: introducendo queste mutazioni in altre leguminose attraverso le TEA si potrebbero ottenere varietà insensibili al fotoperiodo per renderle adatte alla coltivazioni in ambienti diversi.

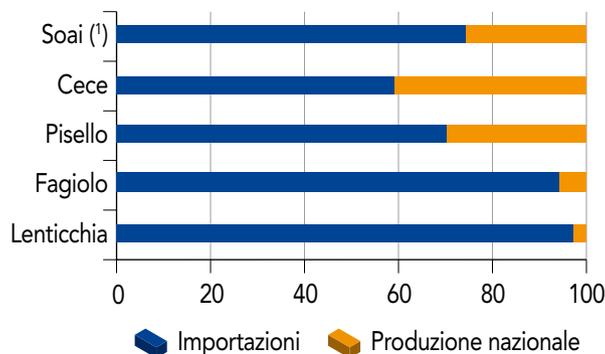
## Più qualità nutrizionale

I legumi possiedono ottime proprietà nutrizionali, ma accumulano anche composti ad azione antinutrizionale che ne limitano l'utilizzo, in particolare se il consumo è a crudo come avviene per l'industria mangimistica. Gli antinutrienti più significativi per la loro rilevanza di tipo economico, salustico e/o ambientale sono gli antimetaboliti proteici (lectine e inibitori di tripsina), l'acido fitico e i raffinossaccaridi.

Le lectine sono proteine tossiche che, se non opportunamente inattivate mediante cottura, producono danni all'epitelio intestinale causando problemi di assorbimento dei nutrienti e disturbi gastrointestinali anche severi. Gli inibitori di tripsina interferiscono con la digeribilità delle proteine e quindi ne riducono l'assorbimento.

L'acido fitico è una molecola che nella pianta funge da riserva di fosforo e ha una forte azione chelante dei cationi minerali. L'uomo e gli animali monogastrici non sono in grado di dige-

**GRAFICO 1 - Importazioni e produzioni nazionali di leguminose da granella nel 2015 in Italia**



(\*) Semi, farina e pannello proteico.

Fonte: Report sui legumi e sulle colture proteiche nei mercati mondiali, europei e italiani, Istituto di ricerca Areté, 2018.

rire l'acido fitico, di conseguenza non riescono ad assorbire i minerali essenziali e il fosforo a esso legati. Inoltre, la presenza di grandi quantità di acido fitico non digerito nelle deiezioni animali alimentati con semi di leguminose e loro derivati crea problemi di eutrofizzazione delle acque. I raffinossaccaridi sono oligosaccaridi che non possono essere digeriti in quanto nel nostro intestino mancano gli enzimi specifici, ma sono digeriti dalla flora batterica con produzione di gas.

A questi composti si aggiungono altri fattori antinutrizionali, presenti solo in alcune specie di legumi, come gli alcaloidi nei lupini, oppure la vicina e la convicina, accumulate nei semi delle fave, che causano il favismo.

Un altro esempio è il latirismo, una malattia neurologica causata dall'accumulo dell'acido ossalildiamminopropionico (ODAP) nelle proteine dei semi della cicerchia, un legume tipico del Sud Italia.

Il processo di domesticazione ha portato alla selezione di genotipi con ridotto contenuto di queste sostanze antinutrizionali. Grazie all'attività di valutazione della variabilità genetica naturale (biodiversità) e indotta (mutagenesi) è stato poi possibile identificare i genotipi con queste caratteristiche.

Tuttavia, questi genotipi sono purtroppo dei casi isolati e l'ottenimento di varietà di legumi prive di composti antinutrizionali è attualmente ancora una sfida aperta e molto complessa. Le TEA rappresentano anche in questo caso una grande opportunità per raggiungere questo obiettivo. **Le conoscenze sui geni implicati nella sintesi dei fattori antinutrizionali in alcune**

**specie più studiate e le risorse genomiche disponibili per molte di esse permetterà di identificare geni in altre specie e di modificarli mediante TEA.**

Lo stesso vale per i geni della sintesi di acido fitico e raffinossaccaridi. Infine, sono stati identificati alcuni geni coinvolti nella sintesi degli alcaloidi nel lupino. Mediante le TEA si potrebbero prendere due piccioni con un lupino: dimostrare il ruolo funzionale di tali geni e produrre un genotipo già migliorato sotto il profilo nutrizionale.

## Malattie e parassiti

Le malattie sono tra i fattori che limitano maggiormente la produttività delle leguminose. Tra gli agenti patogeni particolarmente dannosi vi sono funghi (che causano oidio, ruggine, antracnosi e fusariosi), oomiceti (peronospora e marciumi), virus e piante parassite. L'incidenza e importanza delle diverse malattie è variabile a seconda del tipo di leguminosa e dell'area geografica.

I patogeni producono molecole che interagiscono con specifiche molecole prodotte dalla pianta ospite (bersagli) permettendo così l'infezione. I geni della pianta responsabili della sintesi delle molecole bersaglio sono quindi fattori di suscettibilità alle malattie, vere e proprie chiavi con cui i patogeni possono entrare nella pianta. Negli ultimi vent'anni, la ricerca ha permesso di identificare decine di geni di suscettibilità in diverse piante coltivate. **Le TEA consentono di inattivare questi geni di suscettibilità ottenendo piante resistenti riducendo l'impiego di fitofarmaci.**

## I limiti delle TEA

Al momento attuale l'applicabilità su ampia scala delle TEA nei legumi trova un importante ostacolo nella bassa efficienza dei protocolli per la rigenerazione *in vitro* delle cellule, una volta introdotte le modificazioni desiderate. È necessario infatti aumentare l'efficienza e la riproducibilità, agendo sulle cellule totipotenti in grado di crescere, dividersi e rigenerare una pianta intera. ●

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.

● LA RICERCA IN ITALIA È GIÀ IN GRADO DI OTTENERE OTTIMI RISULTATI

# Le TEA porteranno a viti più resistenti alle avversità

**L**e coltivazioni viticole rappresentano una componente essenziale dell'agricoltura nazionale italiana. L'Italia è il primo produttore vitivinicolo mondiale con una produzione media di 50 milioni di ettolitri di vino l'anno e una quota di mercato pari al 16,7%, davanti alla Francia (14,3%) e alla Spagna (11,7%) (Istat, 2020).

Nel 2019 il valore delle esportazioni di vino prodotto in Italia è stato di oltre 6,4 miliardi di euro, in crescita del 3,4% rispetto al 2018 e del 41,3% rispetto al 2011. Il patrimonio varietale italiano conta di oltre 500 vitigni ad uva da vino iscritti nel Registro nazionale delle varietà, di cui 70 sono varietà a prevalente diffusione italiana, mentre le restanti sono internazionali.

L'importanza economica del prodotto vite-vino per il comparto agroalimentare è ben nota ed esemplificata dallo straordinario successo commerciale di numerosi prodotti, successo che si riflette anche nei dati relativi alle superfici coltivate e ai volumi di vendita ed esportazione.

A ciò va aggiunto che l'Italia è il secondo produttore al mondo di uva da tavola dopo il Cile e prima di Stati Uniti e Sudafrica. Con una media produttiva nel periodo 2009-2018 di oltre 1,1 milioni di tonnellate, pari a un valore della produzione oscillante tra 1,2 e 1,5 miliardi di euro, il nostro Paese è il principale riferimento europeo in questo settore dove le esportazioni rappresentano una quota di mercato crescente (31% nel 2004, 45% nel 2018) a fronte di un mercato interno sostanzialmente stabile. L'uva da tavola è il secondo prodotto frutticolo per valore delle esportazioni dopo le mele. Alcune varietà sono prodotti di eccellenza, rappresentativi del made in Italy.

Il mantenimento di queste eccellenze non può essere dato

Il comparto enologico e quello dell'uva da tavola vedono l'Italia ai primi posti della produzione mondiale con una rilevanza economica fondamentale per il made in Italy. Per restare ai vertici, però, non basta la tradizione: occorre innovare per affrontare difficoltà climatiche e di mercato. Per questo le TEA sono uno strumento essenziale

per scontato, sia per la crescente competizione internazionale, sia soprattutto per le mutate condizioni climatiche e di mercato che richiedono, come in molti settori produttivi, uno sforzo importante di innovazione e adeguamento alle nuove sfide commerciali.

Alcuni esempi riguardano la necessità di identificare varietà resistenti alle malattie e la richiesta sempre maggiore di

varietà da tavola senza seme che siano anche riconoscibili per tipicità e richiamo del territorio.

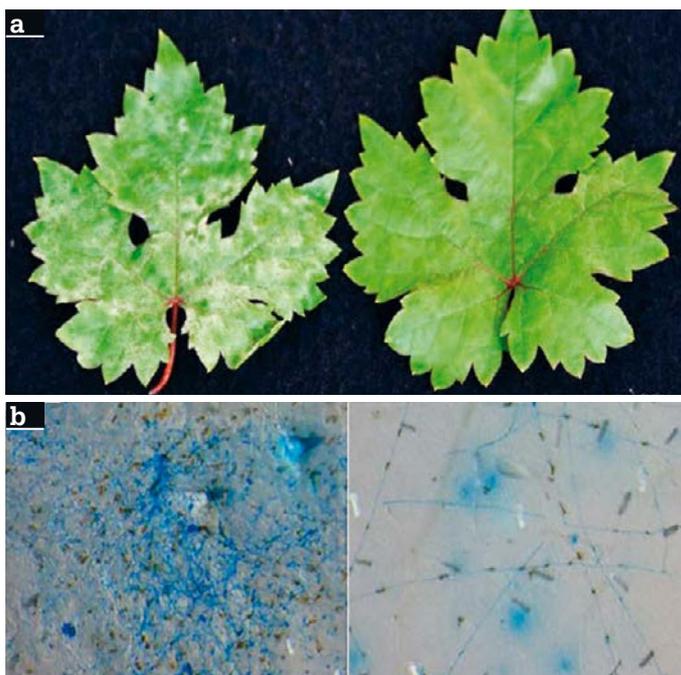
## Migliorare o non migliorare la vite?

La viticoltura, in particolare quella da vino, è un settore molto legato alle tradizioni e a pratiche consolidate.

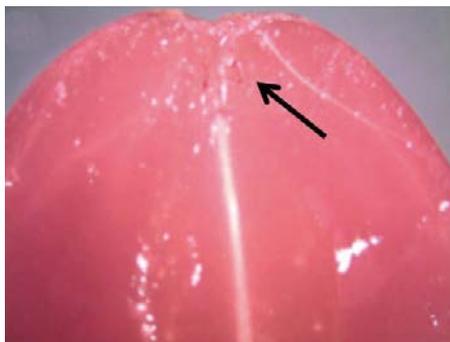
Poche specie coltivate hanno avuto una così scarsa apertura all'innovazione genetica come la vite da vino, ancorata al binomio vitigno-terroir, per cultura, pratiche enologiche ed esigenze di promozione commerciale.

Per decenni l'innovazione genetica in viticoltura non si è spinta oltre l'adozione di mutazioni spontanee o il recupero di qualche vitigno autoctono abbandonato. Tuttavia, le varietà di maggior pregio per la produzione vitivinicola sono generalmente molto suscettibili a patogeni e parassiti e soffrono in maniera crescente delle avversità ambientali, esacerbate ora dai cambiamenti climatici in atto.

Non ci sono attualmente cloni di vitigni nazionali tipici resistenti alle principali malattie, evidenziando quindi che né la selezione clonale di mutazioni spontanee e casuali, né la riscoperta di vitigni abbandonati sono state in grado di fornire soluzioni effi-



**Foto 1** Classici segni di oidio su una foglia di vite di varietà di vite suscettibile (WT) e su una foglia di vite in cui i geni di suscettibilità sono stati spenti (a). Ingrandimento al microscopio delle colonie di oidio sulle due stesse foglie, mentre nella pianta suscettibile il micelio è abbondante e chiaramente visibile dopo colorazione con blu di anilina, sulla foglia mutata si sono sviluppate solo rare ife del patogeno (b)



**Foto 2** Acino d'uva da tavola con seme (a **sinistra**); acino d'uva senza seme per aborto prematuro dell'embrione (indicato dalla freccia) (a **destra**)

caci per la difesa senza ricorrere all'ausilio di mezzi chimici.

Nell'ultimo decennio sono state prodotte nuove varietà resistenti alle due principali malattie, peronospora e oidio, mediante generazioni di reincrocio, che hanno permesso di incrementare la qualità enologica rispetto a varietà precedenti, e incroci tra diverse linee resistenti che hanno unito in una unica varietà diverse sorgenti di resistenza genetica.

Queste generazioni più avanzate di incrocio e reincrocio possono essere equiparate a tutti gli effetti a varietà di *Vitis vinifera* e non più agli ibridi interspecifici, per caratteri ampelografici, caratteristiche agronomiche e proprietà enologiche. Alcune di queste varietà sono iscritte al registro varietale e già disponibili in commercio. Si tratta però di varietà nuove, che non potranno mai riprodurre pienamente le caratteristiche biologiche ed enologiche di uno e di entrambi i genitori e che possono essere utilizzate, secondo la normativa vigente, solo per la produzione di vini da tavola o vini igt.

Mantenere le caratteristiche qualitative e la grande varietà del patrimonio ampelografico tradizionale italiano, conferendo ai vitigni più pregiati caratteri di resistenza a stress biotici e abiotici, è una richiesta che emerge da ogni parte del settore vitivinicolo e rappresenta una sfida che il mondo della ricerca è chiamato a raccogliere e che può essere affrontata efficacemente con le TEA.

### TEA per una viticoltura sostenibile

La difesa fitosanitaria della vite impiega annualmente circa 62.000 tonnellate di soli fungicidi, quantità che rappresenta il 65% di tutti i pesticidi impiegati in agricoltura nell'UE (fonte Eurostat, report 2007). È evidente che un impiego così massiccio di fitofar-

maci non è più accettabile, come dimostrato dall'emanazione di regolamenti comunitari sempre più restrittivi in termini di dosi di impiego consentite per principi attivi inorganici, come il rame, e messa al bando di principi attivi organici ad alta efficacia ma elevata classe tossicologica.

Mentre la disponibilità di alternative efficaci a basso impatto ambientale rimane molto limitata, la resistenza delle piante stesse come forma di risposta «immunitaria» alle malattie rappresenta una risorsa molto potente, che permetterebbe di ridurre drasticamente l'impiego della chimica in agricoltura. In quest'ottica le TEA sono una grande opportunità.

### Resistenza a oidio e peronospora

L'oidio, causato dal fungo *Erysiphe necator*, e la peronospora, causata dal fungo *Plasmopara viticola*, se non controllati risultano devastanti.

Per il controllo di queste due malattie sono necessari fino a 15-20 trattamenti a stagione nelle aree produttive dove le condizioni ambientali risultano particolarmente favorevoli allo sviluppo di tali patogeni.

Con approcci di mutagenesi mirata è possibile inattivare i geni che determinano la suscettibilità al patogeno. I geni di suscettibilità della pianta mediano infatti il riconoscimento dell'ospite da parte del patogeno oppure ne facilitano il processo di infezione. Di conseguenza, una volta resi non funzionali, la malattia non si sviluppa.

Tra i geni di suscettibilità all'oidio i più noti sono quelli della famiglia Mlo (Mildew-Locus-O) scoperti per la prima volta nell'orzo. Nella vite sono presenti 17 geni Mlo, ma è stato dimostrato che inibendo l'espressione di 4 di questi si riduce la suscettibilità alla malattia (foto 1).

Più recentemente, sulla base di informazioni ottenute in piante modello e in varietà di vite di origine caucasica, sono stati identificati anche potenziali geni di suscettibilità a peronospora. Tra essi vi sono due geni chiamati DMR6 (Downy Mildew Resistance 6) e un gene LOB (Lateral Organ Boundaries).

Resta da capire quanti e quali siano i geni di suscettibilità da rendere non funzionali tramite TEA per ottenere viti più tolleranti a oidio e peronospora e se questa procedura porti a effetti indesiderati alle caratteristiche fenotipiche della pianta soprattutto nel medio-lungo periodo, tenuto conto che la vita media di un vigneto è di svariate decine di anni.

Anche approcci di cisgenesi potrebbero essere impiegati per trasferire uno o più geni di resistenza, già presenti in viti selvatiche o coltivate, nella varietà di interesse. Al momento i geni di resistenza a peronospora e oidio identificati con precisione sono pochi, ma recentemente ne sono stati individuati alcuni come i geni Rpv1 e Rpv3-1 per la resistenza a peronospora e il gene RUN1 per la resistenza a oidio.

Adottando approcci di cisgenesi si otterrebbero viti migliorate con due vantaggi fondamentali: l'accorciamento dei tempi e l'assenza di caratteri indesiderati portati dal genitore resistente.

Inoltre, le TEA consentirebbero di inserire i geni di resistenza potenzialmente in tutte le varietà di interesse, mantenendo le caratteristiche di elevata qualità e le specificità tipiche della cultivar di partenza e valorizzando anche cultivar di interesse locale.

### Resistenza a stress abiotici

Negli ultimi decenni, la composizione della bacca e di conseguenza la qualità dei vini hanno beneficiato dell'effetto dell'esposizione a moderati stress termici e idrici. Tuttavia, nell'immediato futuro si stima che, in molte regioni viticole, l'estremizzazione delle condizioni climatiche renderà la coltivazione della vite economicamente svantaggiosa o modificherà lo stile del vino che si può ottenere con le varietà attuali nei tradizionali areali di coltivazione.

Tale impatto negativo si abatterà anche nell'area mediterranea. C'è quindi un interesse crescente verso lo sviluppo di varietà resistenti agli stress ambientali più ricorrenti, quali carenza idrica, eccesso di sali nel terreno, alte e basse temperature. Questi caratteri sono molto difficili da studia-

re e da migliorare poiché hanno una base genetica complessa e sono molto influenzati dall'ambiente.

Tuttavia, ci sono indicazioni che l'attività di alcuni geni sia sufficiente ad aumentare la tolleranza a uno specifico stress abiotico. Se ciò fosse confermato si aprirebbero importanti prospettive per il futuro della viticoltura, dal momento che con le TEA sarà possibile intervenire in tempi rapidi sull'attività di pochi geni chiave. Alcuni interventi a breve medio-termine potrebbero avere come bersaglio i geni che regolano il flusso dalle radici alla chioma, per intervenire sui portainnesti e renderli ancora più efficaci nelle situazioni di carenza idrica.

## TEA per migliorare i caratteri agronomici

### Assenza di semi

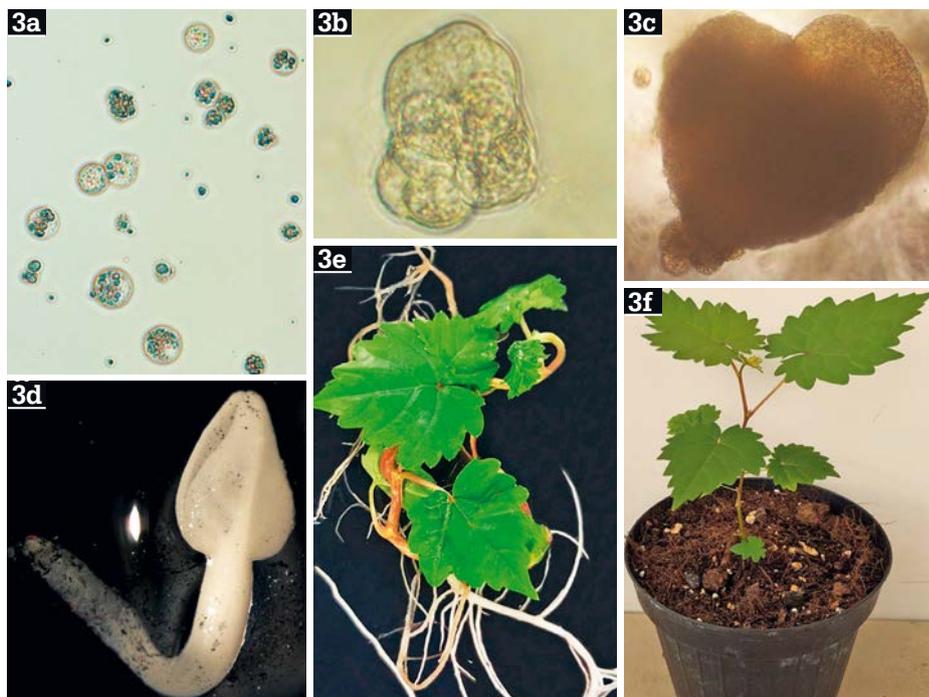
È solo a partire dagli ultimi decenni che l'Italia ha ripreso l'attività di miglioramento genetico per l'uva da tavola e questo pone il nostro Paese in una condizione di ritardo che ha favorito Paesi emergenti che hanno saputo cogliere in anticipo il cambiamento di gusto dei consumatori.

Ecco perché nell'ambito del miglioramento genetico dell'uva da tavola le TEA offrono una duplice opportunità: da un lato la possibilità di recuperare il gap temporale che si è creato, dall'altro quello di valorizzare le varietà più apprezzate e rappresentative del made in Italy, modificando in esse solo le caratteristiche desiderate.

Un carattere ricercato è l'assenza di semi (apirenia) (foto 2). L'identificazione di un gene coinvolto nello sviluppo dell'ovulo ha aperto la strada all'applicazione dell'editing di questo gene in vite: agendo in maniera mirata, è possibile replicare gli effetti della mutazione naturale che rende apirenica l'uva sultanina, ad esempio, nelle varietà Italia e Vittoria, conservandone al tempo stesso le caratteristiche che le hanno rese varietà di successo, come la dimensione della bacca, la croccantezza, l'aroma moscato, ecc.

### Fenologia e componente aromatica

La viticoltura italiana e mondiale deve fare i conti con gli effetti dei cambiamenti climatici sulla fisiologia della pianta e sullo sviluppo della bacca. Uno



**Foto 3** Fasi di rigenerazione della pianta di vite da protoplasti. **a:** protoplasti; **b:** microcolonia; **c:** fase embrionale a cuore; **d:** fase embrionale cotiledonare; **e:** embrione germinato; **f:** pianta sviluppata

degli effetti più evidenti legati all'aumento delle temperature è l'anticipo di tutte le fasi fenologiche della pianta, inclusa la maturazione, che avviene in un periodo dell'anno più caldo con ricadute negative sulla qualità dell'uva.

L'applicazione delle TEA ai regolatori molecolari del processo di maturazione potrebbe consentire di controllarla e di ricollocarla nel periodo dell'anno più adatto all'espressione della qualità.

## Come rigenerare una pianta di vite non ogm

Per l'ottenimento di una pianta di vite modificata attraverso le TEA, una metodologia molto promettente è quella che si basa sui protoplasti, cellule private della loro parete cellulare che sono in grado di rigenerare una pianta intera (totipotenti).

I componenti molecolari dell'editing, ovvero il complesso proteina CAS9 e l'RNA guida appropriato e i reagenti necessari per il suo funzionamento, sono inseriti nei protoplasti dove agiscono producendo la modifica desiderata. I protoplasti così trattati sono quindi messi in coltura in vitro per rigenerare l'intera pianta (foto 3).

Questo sistema ha vantaggi enormi: il complesso di editing è degradato naturalmente dalla pianta e solo modifi-

che limitate di uno o più geni specifici sono ottenute, indistinguibili da mutazioni che possono avvenire normalmente in natura.

Ci sono ovviamente aspetti della tecnica che devono essere perfezionati, quali la messa a punto di un protocollo di rigenerazione specifico per ogni varietà

Recentemente sono stati ottenuti risultati promettenti relativi alla possibilità di inserire direttamente in pianta il complesso molecolare dell'editing, senza passare per le cellule totipotenti. Un limite di questo approccio è che molto raramente tutte le cellule trattate sono modificate. Ciò porta al fenomeno detto chimerismo, ossia la presenza di cellule modificate e non nello stesso individuo.

Tuttavia, sfruttando la moltiplicazione per via vegetativa tipica della vite, una volta consolidato il metodo, si potrebbero ottenere piante con le variazioni desiderate senza modificare irrimediabilmente l'assetto genetico irripetibile delle varietà di pregio utilizzate per le uve da vino e da tavola. ●

*La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.*

FONDAMENTALE IL SEQUENZIAMENTO DEL GENOMA

# Grazie alle TEA la frutticoltura può essere 2.0

I fruttiferi rappresentano un gruppo di colture di importanza fondamentale per il settore agroalimentare del nostro Paese. Nel 2014 la frutticoltura italiana ha prodotto un fatturato di 3,35 miliardi di euro, pari al 6,7% di quello dell'intero sistema agricolo (figura 1).

L'Italia è tra i primi Paesi al mondo per superficie occupata da pomacee (melo e pero), drupacee (pesco, ciliegio, susino, albicocco e mandorlo), actinidia e fragola.

Il miglioramento genetico consente l'ottenimento di nuove varietà di fruttiferi per soddisfare le esigenze in relazione a problematiche di mercato e agroambientali. Tra gli obiettivi si possono menzionare l'ampliamento del calendario di fioritura e maturazione (foto 1), la diversificazione pomologica, l'estensione della conservabilità del prodotto e la resistenza/tolleranza a malattie e stress ambientali. A questi si aggiungono oggi la resilienza ai cambiamenti climatici e l'adattabilità a sistemi colturali a basso input.

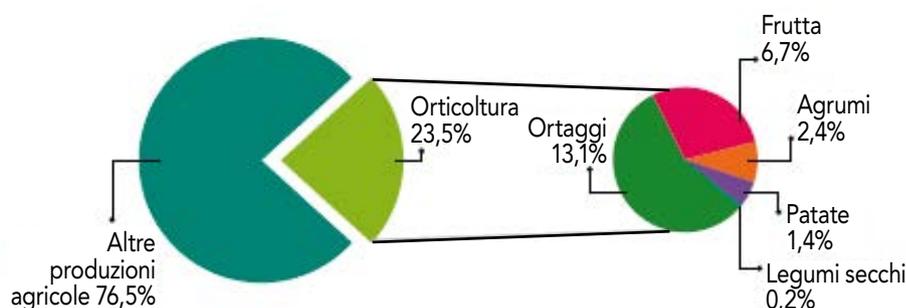
## Miglioramento genetico: le possibilità

Il miglioramento genetico delle specie arboree da frutto può effettuarsi attraverso l'incrocio intra o interspecifico. Questo approccio comporta l'impiego di ingenti risorse sia in termini di spazio, sia di personale, e richiede molti anni poiché è necessario allevare diverse generazioni, ognuna caratterizzata da una prolungata fase giovanile. Tanto per fare un esempio, ci sono voluti oltre 70 anni per introdurre in cultivar commerciali di melo la resistenza alla ticchiolatura a partire dalla specie selvatica *Malus floribunda*.

In alternativa all'incrocio, il miglioramento genetico convenzionale dei fruttiferi ha fatto largo uso della mu-

Dal melo alla fragola, dall'actinidia al pesco, sono già tanti e molto importanti i risultati ottenuti in tutte le principali colture fruttifere applicando le Tecniche di Evoluzione Assistita, che permettono interventi mirati e tempi molto più ridotti per ottenere nuove varietà

FIGURA 1 - Importanza della frutticoltura in Italia rispetto all'intero sistema agricolo



Fonte: Nomisma Società di studi economici spa, 2016.

tagenesi artificiale, che consiste nel selezionare individui dalle caratteristiche desiderate ottenute in seguito a trattamenti con agenti mutageni chi-

mici o fisici, quali i raggi X o gamma.

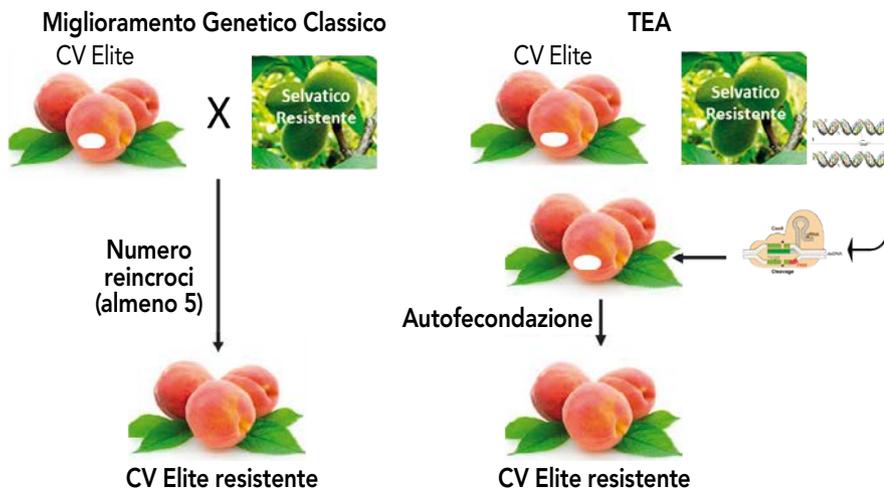
Sono note decine di varietà di pomacee e drupacee ottenute per mutagenesi che hanno avuto un grande successo commerciale. Non sono stati evidenziati effetti avversi per l'uomo o l'ambiente dovuti all'utilizzo di varietà ottenute per mutagenesi; tuttavia, è importante sottolineare che questo procedimento agisce in maniera casuale, e dunque non è possibile indirizzarlo e prevedere quali geni saranno modificati.

Le più recenti scoperte nel campo della biologia molecolare hanno portato allo sviluppo delle TEA che includono la cisgenesi e i metodi avanzati per la modifica del genoma. Rispetto ai metodi di miglioramento genetico convenzionali, le TEA pos-



Foto 1 Pescheto in fiore in provincia di Roma. Il controllo della fioritura e l'ampliamento del calendario di maturazione sono obiettivi fondamentali del miglioramento genetico

**FIGURA 2 - Confronto tra programma di miglioramento genetico tradizionale (incroci) e quello basato sulle tecniche di modificazione del genoma, per l'introduzione di una resistenza a una malattia**



sono ridurre enormemente il tempo necessario per ottenere nuove varietà (figura 2) e permettono l'intervento mirato su geni di interesse.

## Risultati molto promettenti con le TEA

Intenso è il lavoro di ricerca a livello nazionale e internazionale per applicare le TEA ai fruttiferi. Ciò non stupisce, considerando la versatilità di queste tecniche, potenzialmente applicabili anche a fruttiferi minori, ma con grande importanza locale, e la

velocità con la quale esse permettono lo sviluppo di nuove varietà pronte per il mercato.

A oggi vi sono due cloni cisgenici di melo in valutazione in Svizzera e Olanda, ottenuti trasferendo la resistenza al colpo di fuoco batterico e alla scabbia da *Malus floribunda* nella varietà Gala (foto 2). Per ciò che concerne i metodi avanzati per la modifica del genoma, molto promettenti sono i risultati ottenuti in melo e pero per migliorare la **resistenza al fuoco batterico**, attraverso l'inattivazione di un gene che determina la suscettibilità

al patogeno, e il periodo di fioritura.

Straordinari sono i risultati ottenuti in actinidia e in fragola, e in particolare l'azzeramento della fase improduttiva giovanile e l'incremento del contenuto in zuccheri.

Nell'ambito del progetto BIOTEch, finanziato dal Mipaaf, le TEA sono impiegate nelle drupacee per l'ottenimento di varietà di **pesco** a portamento colonnare, più efficienti nella captazione della luce e più adatte alla raccolta meccanizzata dei frutti, e resistenti a sharka, una gravissima virosi del pesco per la quale non esistono fonti di resistenza nel germaplasma della specie.

## Presupposti per l'applicazione delle TEA

La possibilità di applicare le TEA nel miglioramento genetico si basa su due presupposti fondamentali.

- Il primo è la conoscenza della sequenza e la funzione dei geni che sottintendono caratteri di interesse. Si evidenzia in tal senso come la genetica dei fruttiferi abbia avuto un impulso decisivo in seguito al completamento di numerosi progetti di sequenziamento genomico.
  - Il secondo è la disponibilità di efficienti sistemi di coltura *in vitro* in grado di rigenerare, a partire da tessuti o protoplasti, piante adulte che esprimano stabilmente i caratteri introdotti.
- Diversi gruppi di ricerca in tutto il mondo sono attualmente molto impegnati nella messa a punto di solide metodologie per la rigenerazione di fruttiferi: una soluzione a questo problema potrebbe venire proprio dalle TEA applicate all'identificazione dei geni che controllano la capacità di rigenerazione. ●

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.



**Foto 2** Foglie di melo varietà Gala infettate con il fungo della ticchiolatura *Venturia inaequalis*: a **sinistra** cultivar priva della resistenza (S), a **destra** la cultivar che ha nel proprio genoma il gene della resistenza derivato da *Malus floribunda* (R). Sulla foglia di **sinistra** si può osservare un'abbondante sporulazione del fungo, assente nella varietà migliorata (Fonte: Stefano Tartarini, Università di Bologna)

UNA COLTURA IMPORTANTE PER LA FRUTTICOLTURA ITALIANA

# Anche gli agrumi in corsa verso le TEA

**G**li agrumi sono una delle specie arboree da frutto più diffuse e importanti al mondo e l'Italia, con la Spagna, è il principale Paese produttore ed esportatore d'Europa. Secondo le stime della World Citrus Organisation, l'Italia ha registrato una crescita della produzione pari a +12% per la stagione 2020-21, con una raccolta che dovrebbe raggiungere 3,2 milioni di tonnellate, di cui oltre 2 milioni sarà destinata al mercato interno europeo, mentre la rimanente parte sarà destinata alla trasformazione industriale e all'esportazione. Ciononostante, i cambiamenti climatici e le richieste dei consumatori possono contribuire a una deviazione nelle tendenze di mercato.

## Un ricco germoplasma

Certo è che il ricco germoplasma di cui dispone l'Italia ha rappresentato e continua a rappresentare una risorsa preziosa per rispondere a obiettivi fondamentali (foto 1). È importante ricordare che la quasi totalità delle varietà di agrumi appartenenti alle diverse specie sono mutanti somatici naturali, per cui molte delle varietà coltivate sono il risultato di lunghi programmi di selezione, iniziati proprio partendo da una ricca biodiversità.

Ad esempio, la cultivar di arancio «Tarocco» vanta oltre 50 cloni diversi, alcuni già molto diffusi nei mercati internazionali, altri a tutt'oggi in valutazione presso gli istituti di ricerca (CREA-Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura di Acireale, provincia di Catania, e Università di Catania), distinti tra loro per forma del frutto, colorazione esterna e interna, epoca di maturazione.

Analogo panorama è presente nel limone per il quale, nell'ambito della cultivar «Femminello», esistono numerosi cloni selezionati per alcuni caratteri tra cui la resistenza al malsecco (grave fitopatia fungina, foto 2), la rifiorenza, la resa in succo, l'assenza dei semi.

Negli anni, i programmi di miglioramento genetico degli agrumi sono stati

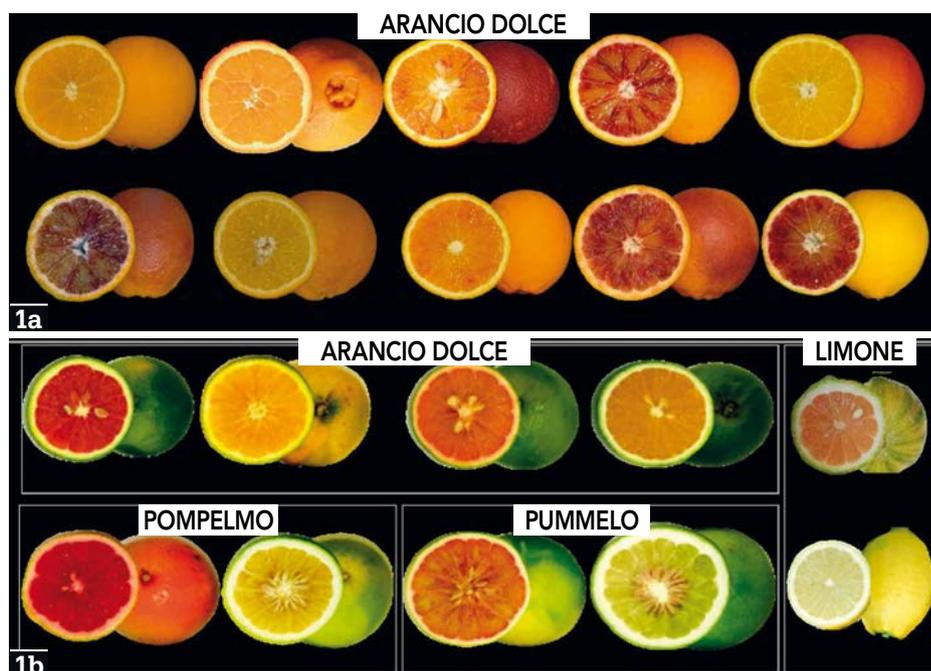
Nonostante le difficoltà che gli agrumi presentano sul versante del miglioramento genetico, sia classico sia innovativo, le TEA hanno ampi margini di sviluppo per ottenere migliori caratteristiche qualitative e resistenza alle principali avversità, dal greening al malsecco

concentrati, come già accennato, sulla valorizzazione del germoplasma e sulla realizzazione di programmi di incrocio, mentre assai meno sull'utilizzo di agenti mutageni. Tuttavia, quest'ultima metodologia ha consentito di dare origine alla varietà di pompelmo a polpa rosa «Star Ruby» (contenente licopene), al limone «Femminello 2Kr», e ad alcuni ibridi di mandarini *easy peeling*, senza semi e pigmentati, quali il «Mandared», o tardivi, come il «Mandalate».

Attraverso l'incrocio sono stati ottenuti ibridi di grande importanza commerciale, quali i mandarino-simili tri-

ploidi (quindi senza semi) costituiti incrociando un individuo tetraploide (generalmente un arancio) con un diploide (mandarino).

Nell'ambito degli ibridi diploidi, il «Sunred» (brevettato dal CREA nel 2017 dopo un lavoro di selezione durato oltre 25 anni), ottenuto dall'incrocio tra il clementine «Oroval» e l'arancio «Moro», è stato selezionato pazientemente tra centinaia di «fratelli» per l'intenso colore rosso del frutto dovuto all'elevato contenuto in antocianine, ben quattro volte superiore a quello del suo genitore «Moro», che rappresen-



**Foto 1** Un estratto esemplificativo di frutti di agrumi della collezione di germoplasma del CREA - Centro di Ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura di Acireale (Catania) con e senza (a) antocianine e (b) licopene



**Foto 2** Sintomi del malsecco su piante di limone: clorosi nervale della foglia (a), imbrunimento del legno (b), seccume con andamento basipeto su giovani germogli (c)

ta tutt'oggi l'arancia più pigmentata.

Altri ibridi diffusi in Europa sono i mandarino-simili «Primosole» e «Simeto» ottenuti da un programma di selezione e di incrocio del satsuma con alcuni mandarino-simili e caratterizzati dalla precocità di maturazione e assenza di semi (apirenia).

## Nuove tendenze e cambiamenti climatici

Negli ultimi anni il mercato agrumicolo, supportato da un lungo e certosino lavoro da parte di genetisti/genetiste e arboricoltori/arboricoltrici, è stato indirizzato verso la richiesta di un prodotto di qualità, in termini di pezzatura, di giusto rapporto tra zuccheri e acidità, di elevata resa in succo, senza tralasciare l'incremento della concentrazione di sostanze a elevato valore nutraceutico e antiossidante.

Al tempo stesso, i cambiamenti climatici stanno alterando gli equilibri degli ecosistemi a tal punto che è sempre più urgente attingere al germoplasma agrumicolo, da cui selezionare varietà e portinnesti in grado di adattarsi a condizioni ambientali spesso difficili e capaci di resistere a malattie causate da patogeni talvolta devastanti.

Sicuramente, tra le patologie più gravi in ambito agrumicolo, già ampiamente diffuse nel mondo ma dalle quali il bacino del Mediterraneo (Italia compresa) risulta essere tutt'oggi indenne, si segnala il cancro batterico degli agrumi (CBC), causato da *Xanthomonas citri*, e il greening (Huanglongbing, HLB), causato da *Candidatus liberibacter*, entrambi batteri da quarantena (foto 3).

Per alcune malattie la possibilità di disporre di genotipi resistenti rappresenta l'unica possibilità per garantire livelli adeguati di produzione e, in alcuni casi, anche per la stessa sopravvivenza dell'agrumicoltura. Per altre, l'adozione di opportune modifiche nella gestione degli impianti (tra cui la scelta del portinnesto) può consentire di mantenere comunque produzioni soddisfacenti. Le specie di *Citrus*, similmente alle altre specie coltivate nelle regioni tropicali e subtropicali, sono suscettibili alle basse temperature, al deficit idrico e alla salinità del terreno. Questi stress, che spesso in condizioni naturali si presentano contemporaneamente, operando in maniera additiva, causano uno stress ossidativo secondario responsabile di effetti nocivi sulla crescita della pianta, sulle rese e sulla qualità.

## Agrumi e TEA

Il miglioramento genetico classico necessita di onerosi investimenti, in termini di risorse economiche, ampi spazi per le prove in campo e lunghi tempi di valutazione, sia per ciò che concerne la selezione delle varietà, sia per la valutazione dei portinnesti.

Il giusto connubio tra tempo e denaro è oggi rappresentato dai vantaggi offerti dall'utilizzo delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) che mirano a ottenere piante che, pur mantenendo inalterato il patrimonio varietale originale e già affermato, siano dotate di quel carattere migliorativo desiderato che diversamente ne rappresenterebbe un difetto.

A tutt'oggi sono davvero pochissimi i risultati attestanti l'utilizzo di suc-

cesso delle TEA in ambito agrumicolo, considerati i tanti limiti della specie, non ultimo la lunga fase giovanile. Il più importante riguarda l'**inattivazione del gene di suscettibilità CsLOB1, che codifica un fattore di trascrizione LBD (Lateral Organ Boundaries Domain), al fine di ottenere piante di arancio dolce resistenti al cancro batterico** (foto 3).

Tuttavia, l'enorme sviluppo della genomica e della capacità di sequenziare interi genomi ha reso disponibili informazioni dettagliate di numerosi genomi tra cui quello di *Citrus sinensis* e di *Citrus clementina*, aprendo la possibilità di trasferire alle diverse cultivar di *Citrus* le conoscenze e le applicazioni ottenute ed effettuate in altre specie.

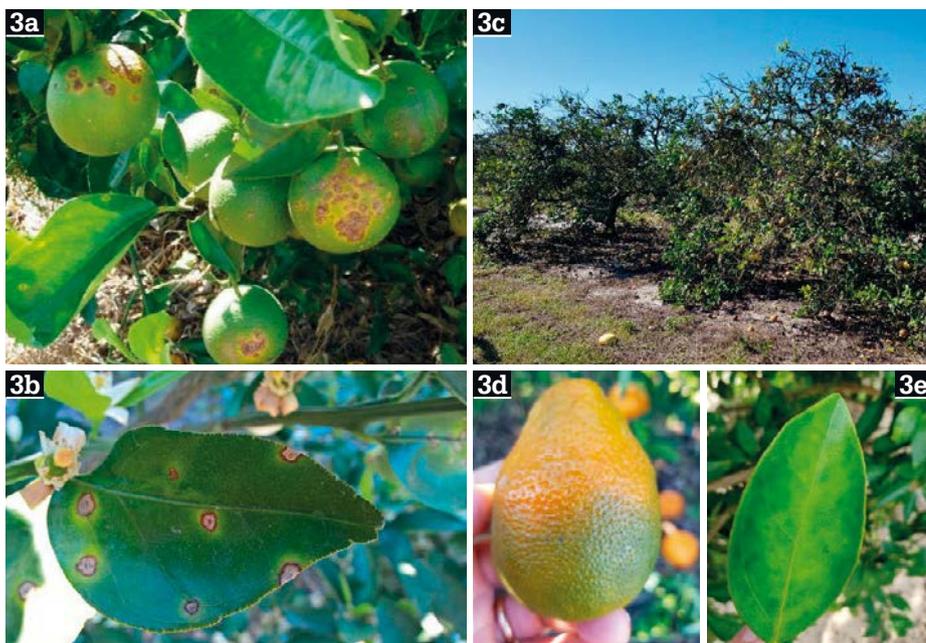
Le prospettive future per le piante di agrumi TEA potrebbero quindi partire dalla modifica mirata di geni con sequenza simile a geni noti e caratterizzati in altre specie e che sono stati identificati anche nei genomi attualmente noti di agrumi.

Ancora più finemente, si potrebbero introdurre piccole alterazioni delle sequenze di regolazione che controllano l'espressione di geni deleteri, impedendone, chirurgicamente, l'espressione. Queste evidenze mostrano il grande potenziale delle TEA e spiegano il motivo per il quale probabilmente questa tecnica sostituirà i tradizionali approcci di miglioramento genetico anche negli agrumi.

Attualmente le biotecnologie applicate agli agrumi sono focalizzate anche nella produzione di cosiddetti *major fruits*, ricchi in sostanze antiossidanti (di cui le antocianine e il licopene sono solo esempi), *easy peeling* ovvero facili da sbucciare (caratteristica tipica dei mandarini e delle clementine), e senza semi. L'ottenimento di *major fruits* negli agrumi può essere perseguito sfruttando la conoscenza dei geni che controllano questi caratteri, alcuni dei quali sono già noti alla comunità scientifica, e mettendo in campo le TEA per modificare varietà già eccellenti e dotarle del carattere desiderato in tempi contenuti (pochi anni) e con un investimento in termini di spazi e di costi assai limitati.

## Che cosa manca?

Gli agrumi hanno alcune caratteristiche biologiche (la lunga fase giovanile, l'incompatibilità sessuale, la poliembriologia, la difficoltà di rigenerare in vi-



**Foto 3** Cancro batterico degli agrumi (CBC) e *greening* (Huanglongbing, HLB), due tra le malattie più devastanti per l'agrumicoltura mondiale. Caratteristici sintomi di CBC in frutti con lesioni che tendono a confluire formando aree crateriformi fessurate (a), e in foglie di arancio (b), le cui lesioni di colore verde scuro rotondeggianti tendono ad allargarsi diventando di colore marrone chiaro. Piante di pompelmo devastate da HLB (c), con tipica deformazione e inversione di colore nel frutto (d) e maculature clorotiche gialle nelle foglie (e)

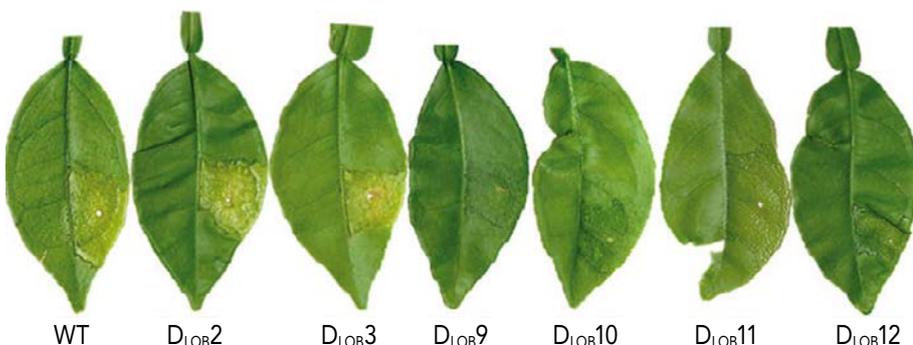
tro alcune varietà) che rendono particolarmente complessa l'applicazione dei metodi di miglioramento genetico, sia quelli classici sia le nuove tecnologie.

Il reale «collo di bottiglia», però, è rappresentato dalla capacità di rigenerare un'intera pianta a partire da singole cellule che hanno acquisito quella specifica mutazione. Alcune varietà agrumicole sono particolarmente ostili e recalcitranti al processo di trasformazione genetica e alla rigenerazione. Una delle sfide più ambiziose consiste proprio nel migliorare la varietà élite, attraverso la messa a punto di speci-

fici protocolli di trasformazione e di rigenerazione.

## TEA: il ruolo dell'Italia

La ricerca di fonti di resistenza sia nel germoplasma agrumicolo, sia in specie appartenenti ai generi affini a *Citrus*, rappresenta l'unica possibilità per fronteggiare la malattia più devastante per gli agrumi, ovvero il *greening*, che ha causato già ingenti danni in diversi Paesi agrumicoli (Cina, USA, Brasile, ecc) e sta minacciando anche l'agrumicoltura di altri Paesi.



**Foto 4** Le sei linee transgeniche Duncan mostrano una differente suscettibilità a Xcc. Dopo 7 giorni dall'inoculazione sono stati osservati gravi sintomi di cancro su pompelmo normale (WT), D<sub>LOB2</sub> e D<sub>LOB3</sub>. Ridotti sintomi del cancro sono osservabili nelle linee D<sub>LOB11</sub> e D<sub>LOB12</sub>. Alcune pustole sono presenti su D<sub>LOB9</sub> e D<sub>LOB10</sub> (fonte Jia et al., 2017)

A questo si aggiunge anche il mal secco che, comparso all'inizio del secolo scorso, ha determinato un grave peggioramento della produzione limoncola italiana sia in termini quantitativi che qualitativi.

In questo contesto è stato da poco completato, per la prima volta al mondo, il sequenziamento del genoma di limone (la varietà sequenziata è stata la cultivar «Femminello Siracusano»).

In parallelo, il sequenziamento dell'mRNA totale in 4 tessuti (radice, foglia, fiore, frutto) ha consentito l'annotazione di 38.205 geni e la loro precisa localizzazione nel genoma. Inoltre, sono state sviluppate due popolazioni segreganti (per un totale di 280 individui) ottenute dall'incrocio di un parentale suscettibile (il già citato limone femminello 2Kr) e parentali tolleranti quali il clementine e il *Citrus latipes* funzionali alla messa a punto di analisi di associazione genotipo-fenotipo.

La disponibilità di un genoma di riferimento per la specie sarà uno strumento indispensabile per il disegno di SNP (Single Nucleotide Polymorphism) utili per genotipizzare le popolazioni segreganti e per le successive analisi QTL (Quantitative Trait Locus) al fine di individuare marcatori molecolari e/o geni candidati coinvolti nei processi di tolleranza al mal secco.

È proprio sullo sfruttamento dei geni di suscettibilità/resistenza che si fonda uno degli obiettivi strategici nell'utilizzo delle TEA. Questo consentirebbe da un lato di contribuire a risolvere alcune tra le minacce più pericolose per l'agrumicoltura mondiale, come il *greening*, dall'altro porterebbe l'Italia a riconquistare quegli spazi di mercato di cui un tempo era leader, come nel caso della limonicoltura.

Inoltre, grazie alla ottimizzazione delle tecniche di cisgenesi e genome editing si potrebbero produrre frutti di agrumi arricchiti in antocianine e licopene, e di mandarini e mandarino-simili senza semi, target qualitativo molto richiesto dai consumatori.

Questi obiettivi rappresentano solo un esempio di come sia necessaria una forte interazione e collaborazione tra le competenze presenti nel territorio nazionale (e non solo) a beneficio di una agrumicoltura di qualità. ●

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.

● IL PUNTO IN ITALIA, IN EUROPA E NEL MONDO

# Le TEA nella ricerca e nel panorama legislativo

**I**l progetto Biotech finanziato dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali con 6 milioni di euro, che si concluderà nel 2022, è la principale iniziativa di ricerca pubblica nel settore TEA. Interessa diverse specie di rilievo per il nostro agroalimentare, sia ortofrutticole sia cerealicole, e mette a sistema il capitale di conoscenze genomiche accumulato in due decenni in numerose istituzioni pubbliche del Paese.

Gli obiettivi per le diverse specie sono stati definiti in stretta sinergia con i portatori di interesse, ovvero associazioni di categoria, imprese, associazioni di produttori e di consumatori.

In generale, si punta a innalzare la qualità e la sostenibilità delle colture, ad esempio rendendole resistenti a malattie per utilizzare meno fitofarmaci o adattando il ciclo di sviluppo ai cambiamenti climatici. Molti altri progetti sono attivi in università ed enti di ricerca pubblici.

## Cosa succede nel mondo

I grafici 1 e 2 forniscono un quadro delle specie coltivate e dei caratteri che sono attualmente oggetto di studio e ricerca pubblica e privata. Sul mercato negli USA sono già presenti i primi prodotti TEA: una patata che non imbrunisce quando tagliata (Innate) o che non accumula acrilammide durante la frittura, una soia con profilo di acidi grassi modificato (Calyno).

In particolare, attualmente sono migliorati mediante TEA la resistenza a parassiti e malattie (pomodoro, vite, riso, cocomero, cetriolo, cassava, melo), la tolleranza agli stress (pomodoro, riso), la resa (colza, riso), il valore nutrizionale (pomodoro, banana), la qualità tecnologica (mais, patata, camelina, riso, soia, colza), la riduzione della tossicità o allergenicità (riso, frumento, colza), la facilità di raccolta meccanizzata (frumento, colza).

L'avanzare della ricerca nel settore TEA e della possibilità della loro piena applicazione è strettamente legato, in particolare nell'Unione europea, alla revisione del quadro normativo che attualmente le equipara agli ogm



## Normativa europea a confronto con gli altri Paesi

Come è stato sottolineato nell'editoriale di questo inserto, l'impiego delle TEA e dei suoi prodotti nell'UE è attualmente fortemente limitato in quanto equiparati agli ogm, e conseguentemente soggette a una regolamenta-

zione molto restrittiva che di fatto ne impedisce l'uso in molti Paesi dell'UE, Italia inclusa.

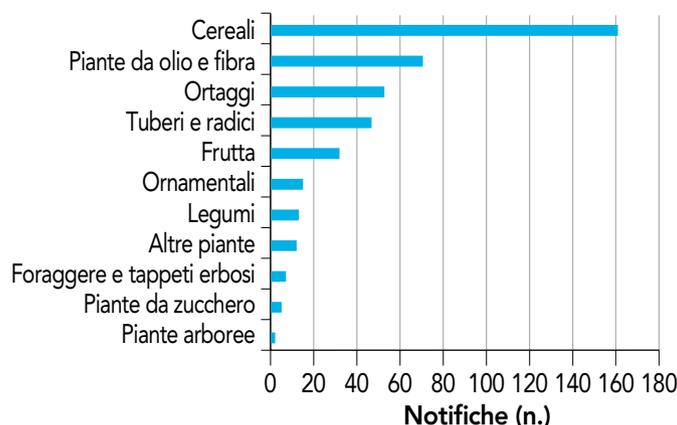
Nel riquadro a pag. 34 è riportata la cronologia dei principali eventi che hanno portato a questa situazione. Ovviamente il tutto nasce dall'invenzione della transgenesi e dal sofferto processo di regolamentazione normativa seguito dall'UE. La fonte normativa di riferimento è la direttiva 2001/18/CE che fornisce anche una definizione di ogm: «un organismo, diverso da un essere umano, il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale».

Come si può immediatamente capire, tale definizione, peraltro utilizzata solo nell'UE, ha carattere esclusivamente normativo e non biologico.

Gli allegati della direttiva specificano meglio l'applicabilità della normativa. L'allegato IB esenta dall'applicazione della normativa i prodotti della mutagenesi fisica e chimica.

Nel primo decennio degli anni 2000 conoscenze approfondite sui meccanismi molecolari di difesa dei batteri nei confronti dei propri virus, basati sul taglio specifico del DNA virale operato da parte di alcune proteine, le cosiddette forbici molecolari, portarono nel 2012 allo sviluppo del metodo Crispr-Cas9 per la modifica mirata del genoma descritto nel capitolo «TEA, miglioramento genetico preciso e veloce». Già l'anno successivo furono

**GRAFICO 1 - Notifiche di piante TEA depositate al giugno 2021**



Su un totale di 444, 260 provengono da enti pubblici e 184 da enti privati.  
Fonte: [https://datam.jrc.ec.europa.eu/datam/mashup/NEW\\_GENOMIC\\_TECHNIQUES/index.html](https://datam.jrc.ec.europa.eu/datam/mashup/NEW_GENOMIC_TECHNIQUES/index.html)

# LA REGOLAMENTAZIONE DELLE TEA NEL MONDO

Negli ultimi anni **molti Paesi si sono attrezzati per regolamentare le tecnologie di genome editing** (figura A), consegnando ai breeder regole chiare, soprattutto nel confronto con le tecnologie che danno origine agli ogm. Regole chiare rendono più semplice la creazione di un contesto nel quale l'innovazione può svilupparsi liberamente. Inoltre, quando basate su un approccio scientifico e fortemente razionale, permettono di adattare alla normativa nuove tecnologie ancora non applicate al breeding, o addirittura non ancora inventate. Ad esempio, **una caratteristica costante di molte normative è che viene valutato il rischio derivante dalla modifica genetica e non la tecnologia utilizzata per produrla**. In pratica, si valuta il prodotto e non il processo.

Secondo la sentenza della Corte di giustizia, in **Europa** le TEA danno origine a piante ogm e la loro coltivazione è di fatto vietata, indipendentemente dal tipo di modifica o di carattere introdotto. La direttiva di riferimento risale al 2001 e norma le tecnologie e non il prodotto ottenuto. Dal punto di vista legale anche le piante ottenute tramite mutagenesi fisica o chimica sono ogm, ma vengono esentate dall'applicazione della normativa sui controlli.

In tutti i Paesi dell'**America Latina** le procedure adottate prevedono come norma comune la notifica a un ente di valutazione. L'ente, entro un ragionevole arco temporale (20-120 giorni), determina caso per caso, se un prodotto

debba essere regolamentato come ogm. **I sistemi SDN1 e SDN2, qualora non lascino residui di DNA esogeno, non sono regolamentati come ogm.**

Negli **Stati Uniti** l'Animal and plant health inspection service (APHIS), l'autorità principale che regola i prodotti vegetali, non sottopone a normativa ogm le varietà derivanti da genome editing che si sarebbero potute ottenere anche tramite tecnologie tradizionali. Una revisione dell'attuale normativa, che entrerà in vigore nel 2021, esenta i prodotti ottenuti tramite editing dalla normativa ogm se i loro genomi presentano delezioni di qualsiasi dimensione, sostituzioni mirate di singole lettere del DNA o introduzione di nuovo materiale genetico proveniente esclusivamente da specie sessualmente compatibili. Anche se non esplicitato, questa classificazione corrisponde alla classificazione SDN1, SDN2 e SDN3 cisgenico (vedi dettaglio nell'articolo a pag. 35). La procedura, qualora necessario, procede a una verifica caso per caso del prodotto geneticamente modificato. Va inoltre sottolineato che se una nuova varietà presenta caratteri già valutati in precedenza da APHIS come non rischiosi per salute e ambiente, essa sarà esentata dalla regolamentazione cui sono sottoposti gli ogm, anche se transgenica.

In **Canada** le nuove varietà vengono sottoposte a controlli di allergenicità, tossicità ed effetto su altri organismi solo

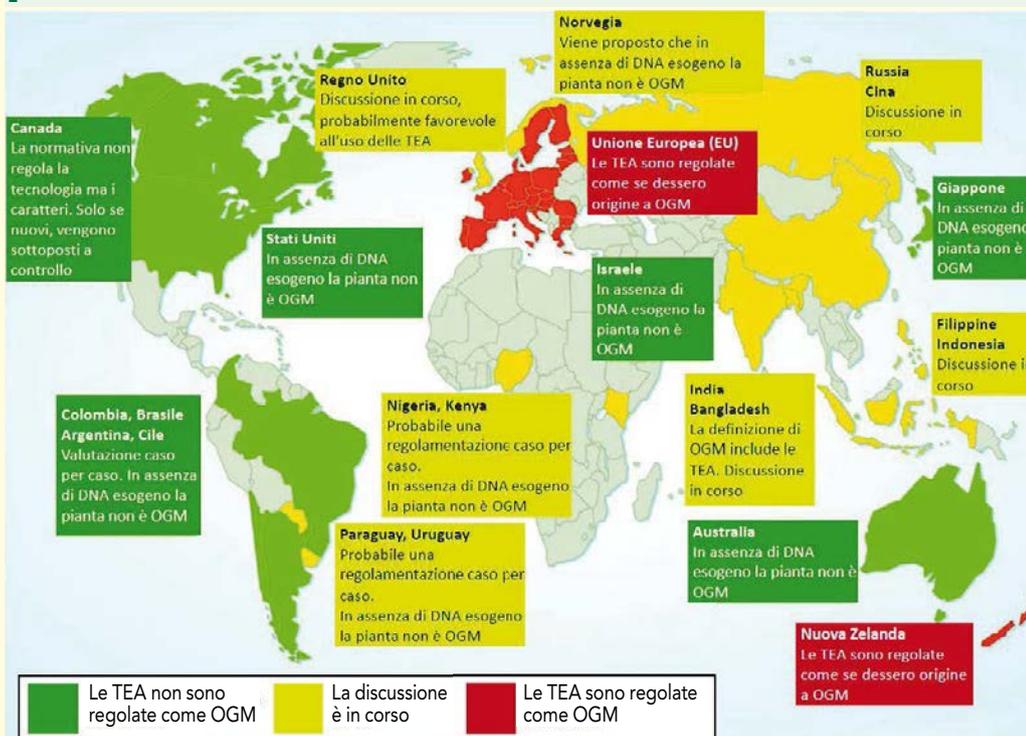
se vengono catalogate come piante con nuovi tratti (PNT). La tecnologia utilizzata per produrle è irrilevante. Una PNT può derivare da breeding classico, transgenesi o TEA.

In **Giappone** le piante editate sono considerate non ogm se non contengono alcun residuo di DNA esterno integrato nel genoma dell'organismo.

La **Cina** ha investito enormi risorse nello sviluppo e applicazione delle tecnologie di editing. Le prove varietali in campo sono possibili, ma al momento l'elaborazione di una normativa nazionale è ancora in corso. È auspicabile che la regolamentazione sarà favorevole all'utilizzo delle TEA.

Anche in **Russia e India** le norme sull'editing non sono ancora definite. ●

**FIGURA A - La regolamentazione nel mondo delle TEA - Tecnologie per l'Evoluzione Assistita**



prodotte le prime piante modificate con queste nuove tecnologie. Nell'UE sia il mondo scientifico sia le organizzazioni della società civile si posero immediatamente il problema se le piante otte-

nute mediante queste nuove tecnologie, e i prodotti da esse derivati, dovessero essere considerate ogm, oppure, almeno in alcuni casi, potessero essere considerati come normali prodotti di

miglioramento genetico, esentati analogamente a quanto accade per piante mutagenizzate con metodo classico.

La questione non è di poco conto, visto che gli ogm non sono attualmen-

te coltivati in Europa, se non in modo trascurabile, a causa delle restrizioni previste dalla direttiva citata e dagli Stati membri.

Il Parlamento europeo ha tardato nel dare linee di indirizzo agli Stati membri circa l'inquadramento legale dei prodotti delle TEA e il vuoto normativo si è risolto in sede giudiziaria, senza appropriata discussione fra i portatori di interesse. Infatti, nel 2018 la Corte europea di giustizia (ECJ) fu chiamata a esprimersi dal Consiglio di Stato francese a seguito di una richiesta sollevata nel 2016 da alcune organizzazioni non governative francesi [si veda Case C-528/16, *Confédération paysanne and others v. Premier ministre and Ministre de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt* (2018), ECLI:EU:C:2018:583, para. 25].

Il Consiglio di Stato francese, in sostanza, chiede alla ECJ:

- gli organismi ottenuti mediante mutagenesi costituiscono ogm secondo la definizione dell'articolo 2 della direttiva 2001/18?

- l'esenzione dall'applicazione della direttiva prevista nell'articolo 3, in combinazione con l'allegato IB, punto 1, si applica solo agli organismi ottenuti con la mutagenesi casuale adottata con sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti, metodi che esistevano prima dell'adozione della direttiva?

La ECJ ha emanato la decisione il 25 luglio 2018.

In risposta alla prima questione la ECJ ha confermato che l'articolo 2 della direttiva deve essere interpretato nel senso che gli organismi ottenuti con metodi di mutagenesi costituiscono ogm.

In risposta alla seconda questione la ECJ ha affermato che solo gli organismi ottenuti con tecniche/metodi di mutagenesi che sono stati utilizzati convenzionalmente per molte applicazioni e hanno una lunga evidenza di sicurezza (*long safety record*) sono esclusi dall'applicazione della direttiva.

Infatti, la ECJ nota che l'esenzione prevista nell'articolo 3, in combinazione con l'allegato IB, punto 1, non può essere applicata a metodi e tecniche

## TEA: PROSPETTIVA STORICA SU SCIENZA E NORMATIVA

1983	Viene prodotta la prima pianta transgenica
1990	La coltivazione degli ogm viene autorizzata in Europa
1990-1997	Nascono i movimenti anti-ogm e viene introdotto il principio di precauzione
1996	Le piante ogm vengono coltivate su larga scala
1998-2004	Nessun nuovo ogm viene autorizzato creando una moratoria di fatto
2001	Pubblicazione della Direttiva EU 2001/18
2012	Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier sviluppano un sistema di modificazione diretta del DNA basato su CRISPR-Cas9
2013	Viene prodotta la prima pianta modificata con CRISPR-Cas9
2015	EU lascia agli Stati membri la decisione sulla coltivazione e l'importazione di ogm sul loro territorio. L'Italia decide per l' <i>opt out</i>
2018	Sentenza Corte europea di giustizia che equipara i prodotti TEA agli ogm
2020	Doudna e Charpentier insignite del Premio Nobel per la Chimica
2019	Il Consiglio europeo chiede alla Commissione europea di effettuare uno studio sullo stato delle nuove tecnologie genomiche
2021	Pubblicazione dello studio della Commissione europea: necessaria nuova regolamentazione

ropa, per il combinato disposto della direttiva 2001/18/EC e della sentenza delle Corti di giustizia europea del 25 luglio 2018 nella causa C-528/16, attualmente tutte le piante, e i loro prodotti, che derivano da TEA sono soggetti alla legislazione sugli ogm.

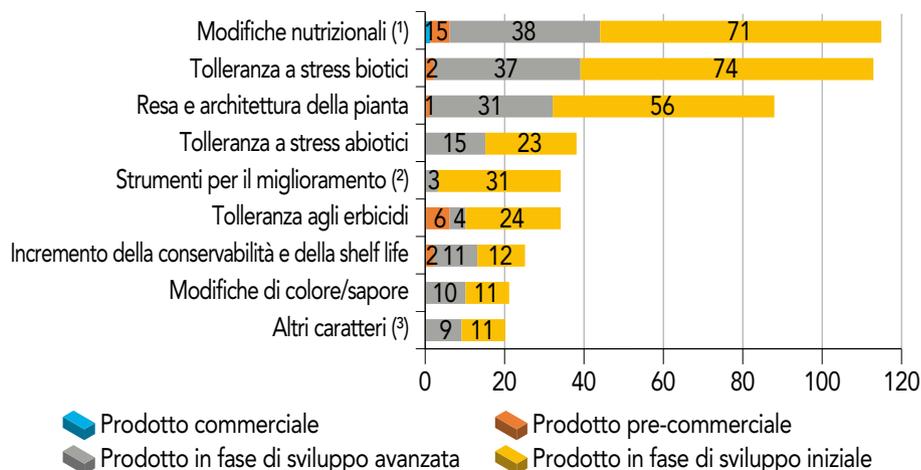
Questa legislazione è incentrata sulle tecniche utilizzate per produrre la pianta modificata, e non sulle caratteristiche peculiari della pianta stessa. Si assiste quindi al paradosso che lo stesso carattere, ad esempio la resistenza a un diserbante o a un parassita, è soggetto alla normativa se è stato ottenuto mediante TEA, mentre non lo è (e può quindi essere portato liberamente in campo e in commercio) se è stato ottenuto con un'altra tecnica, come la mutagenesi con agenti chimici o fisici.

Il paradosso è tanto più eclatante se si considera che la mutagenesi realizzata con TEA è limitata al gene bersaglio, mentre quella chimica o fisica è casuale e risulta in un gran numero di altre mutazioni, che non sono note, in altri geni.

che sono apparse o sono state prevalentemente sviluppate dopo l'adozione della direttiva. Di conseguenza in Eu-

Secondo la sentenza citata possono essere esclusi dall'ambito di applicazione della direttiva solo gli organismi ot-

**GRAFICO 2 - Caratteri e fase di sviluppo delle notifiche di piante TEA**



(1) Comprende le modifiche del contenuto di amido, oli, proteine, vitamine, fibre, sostanze tossiche e allergeni, incluso il glutine. (2) Comprende caratteristiche riproduttive come la maschiosterilità, l'autoincompatibilità e l'induzione di aploidi. (3) Comprende la produzione di molecole di interesse industriale, la modifica del periodo di fioritura e l'efficienza d'uso dell'azoto. Fonte: adattato da [https://datam.jrc.ec.europa.eu/datam/mashup/NEW\\_GENOMIC\\_TECHNIQUES/index.html](https://datam.jrc.ec.europa.eu/datam/mashup/NEW_GENOMIC_TECHNIQUES/index.html)

tenuti con metodi di mutagenesi utilizzati convenzionalmente con una lunga tradizione di sicurezza: le TEA hanno preso il Nobel ma, ahimè, sono troppo giovani per «uscire da sole».

Le conseguenze di questa situazione normativa sono gravi. Già ora un gran numero di imprese e di laboratori europei sperimentano forti limitazioni alla ricerca di base e alle applicazioni delle TEA, anche per il solo fatto di non poter valutare le piante in campo aperto.

Un secondo aspetto preoccupante è che la competizione internazionale è sbilanciata: in alcuni Paesi la tecnologia è utilizzata liberamente, in altri no (grafico 2). Inoltre, le collaborazioni tra organismi di ricerca pubblici e piccole-medie imprese, rese teoricamente possibili dalla relativa semplicità ed economicità delle nuove tecnologie, non possono decollare.

Infine, anche se si decidesse di bandire i prodotti TEA dall'UE non potremmo in pratica farlo: le mutazioni ottenute mediante TEA spesso non possono essere individuate con certezza mediante analisi molecolari e questo mette in crisi i sistemi di tracciamento obbligatori per gli ogm.

La Commissione europea ha appena pubblicato uno studio sulle *new genomic techniques* (che comprendono le TEA). Tramite il confronto con diversi portatori di interesse, tra i quali il coordinamento europeo dei ricercatori del settore EU-SAGE (EUropean Sustainable Agriculture through Genome Editing, della quale SIGA fa parte insieme a circa 130 istituzioni e società scientifiche), lo studio ha evidenziato come le TEA possano contribuire a una produzione agricola sempre più sostenibile, in linea con la strategia Farm to Fork, per il raggiungimento degli obiettivi del Green Deal europeo.

La Commissione ha inoltre evidenziato che l'attuale legislazione sugli ogm (direttiva 2001/18/CE) non è adatta alla regolamentazione di alcune TEA, e necessita di un adattamento alle conoscenze scientifiche e tecnologiche sviluppate negli ultimi anni.

Dallo studio emerge anche la necessità che la valutazione degli eventuali rischi sia fatta caso per caso, non sulle tecnologie utilizzate come avviene per gli ogm, ma sui loro prodotti.

Su queste basi si può guardare con fiducia ai prossimi passaggi di discussione con i legislatori della UE, in vista del futuro sviluppo delle TEA per l'agricoltura europea.

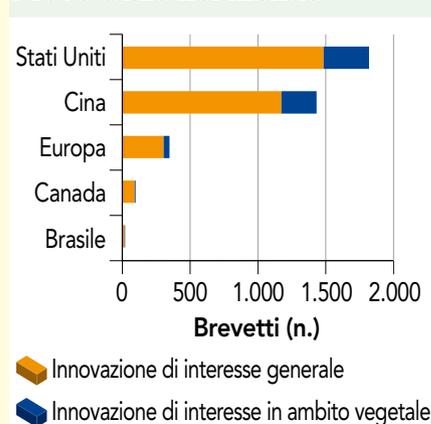
## PRODOTTI SVILUPPATI NEL MONDO TRAMITE TEA

Una recente metanalisi di pubblicazioni scientifiche ha individuato circa 230 studi orientati alla commercializzazione di piante TEA. La lista comprende 41 specie fra cui riso, pomodoro, mais, frumento, orzo, agrumi, kiwi, patata, soia, per un totale di 140 applicazioni. Le principali riguardano il valore agronomico della pianta (43), i caratteri qualitativi del prodotto finale (35), la tolleranza a patogeni e parassiti (23) e la tolleranza agli erbicidi (11).

Più della metà delle applicazioni è stata sviluppata in Cina e negli Stati Uniti (grafico A).

Attualmente hanno raggiunto il mercato la colza resistente a sulfoniluree (Cibus) e la soia ad alto contenuto di acido oleico (Calyxt) negli Stati Uniti e una varietà di pomodoro

GRAFICO A - Lo scenario brevettuale nel mondo



Fonte: Dati elaborati da lens.org.

ro ad alto contenuto di acido gamma amino butirrico (Sanatech Seed) in Giappone.

Certo, una revisione profonda della normativa richiede tempi lunghi. Nel breve periodo, tuttavia, si potrebbero esentare dalla direttiva almeno alcune applicazioni del *genome editing*:

- la mutagenesi per inattivare i geni;
- la modifica mirata di uno o pochi aminoacidi in una proteina;
- la cisgenesi, cioè il trasferimento di geni e di loro varianti, inalterati, tra specie sessualmente compatibili.

Queste applicazioni non sono tutte quelle possibili, ma sono quelle ritenute indispensabili per salvare l'innovazione genetica e valorizzare la biodiversità nell'agricoltura italiana ed europea.

### Quadro internazionale legislazione TEA

Negli USA piante che portano una mutazione derivante da TEA, una sostituzione di una singola base, un gene introdotto da una specie sessualmente compatibile (cisgenesi) o l'alterazione di un gene che riproduce una variante genica (allele) già esistente in natura all'interno della specie non devono essere soggette a un'analisi del rischio: la logica è che tali modificazioni avrebbero potuto verificarsi anche per effetto del miglioramento genetico tradizionale.

Giappone, Israele, Australia e diversi Paesi del Sud America hanno già deciso che piante TEA che non contengano

DNA estraneo non debbano essere considerate ogm. Le informazioni richieste per la loro autorizzazione variano da Paese a Paese: in Giappone, ad esempio, è necessario dichiarare il metodo utilizzato, il carattere modificato, l'assenza di DNA estraneo e il possibile effetto sulla biodiversità.

Il Canada ha da tempo un sistema regolatorio basato saggiamente sul carattere introdotto e non sul metodo utilizzato per introdurlo.

Solo l'UE e la Nuova Zelanda hanno per ora incluso le TEA nella normativa che regola gli ogm.

È opportuno sottolineare che ciò è avvenuto non per scelta dei legislatori, ma per effetto di sentenze di corti giudiziarie. In molti altri Paesi non è ancora stata presa una decisione definitiva, anche se in diversi casi è stato proposto che le piante non debbano essere considerate ogm se non contengono DNA estraneo.

La scelta che sarà fatta dalla Unione europea non avrà conseguenze soltanto sui Paesi dell'UE. Infatti, molti Paesi emergenti, africani *in primis*, saranno fortemente influenzati nelle loro decisioni dalle scelte dell'UE, il che carica la scelta europea di un ulteriore significato politico-etico.

La bibliografia dell'articolo è consultabile a pag. 35.

## Bibliografia degli articoli

### **TEA, miglioramento genetico preciso e veloce (pagine 7-10)**

Després et al. (2003). *Science*, 302: 1206

Doebley et al. (2006) - *Cell*, 127: 1309.

Zhu H. et al. (2020) - *Nature Review Molecular Cellular Biology*, 21: 661.

### **Il rilancio della cerealicoltura passa anche dalle TEA (pagine 11-13)**

Camerlengo F. et al. (2020) - *Food Systems* 4: 104.

Han Y. et al. (2021) - *Plant Communications*, 2: 10082.

Kirschner G.W. et al. (2021) - *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.01.23.427880>

Wang Y. et al. (2014) - *Nature Biotechnology*, 32: 947.

### **Mais e riso più competitivi grazie alle TEA (pagine 14-16)**

BIJ. et al. (2016) *Nature Genetics*. 48: 785.

Li S. et al. (2019) - *Journal of Integrative Plant Biology*, 61: 1201.

Liu L. et al. (2021) - *Nature Plants*, 7: 287.

Xu Z. et al. (2019) - *Molecular Plant*, 12: 1434.

Wang F et al. (2016) - *PLoS ONE* 11: e0154027. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154027>

### **Culture orticole: le TEA per rispondere ai cambiamenti (pagine 17-20)**

Afshin A. et al. (2019) - *The Lancet*, 393: 1958.

Allen L. (2017) - *Journal of Epidemiology and Global Health*, 7: 5.

CREA (2019) - <https://bit.ly/369a7uW>

Martín-Pizarro C., Posé D. (2018) - *Frontier in Plant Science*, 9: 1415.

Ramirez-Torres F. et al. (2021) - *Transgenic Res.* <https://doi.org/10.1007/s11248-021-00240-3>

Salava H. et al. (2021) - *International Journal Molecular Science*, 22: 682.

### **Con le TEA, leguminose più produttive e nutritive (pagine 21-22)**

Atif R.M. et al. (2013) *Gene transfer in legumes*. In: *Progress in botany* Lüttge U, Beyschlag W, Francis D, Cushman J (eds), pp 37 Springer, Heidelberg

Colombo F. et al. (2020) - *Frontiers in Plant Science*, 11: 1301.

Confalonieri M. et al. (1992) - *Plant Breeding*, 109: 329.

Pavan S. et al. (2010) - *Molecular Breeding*, 25: 1.

### **Le TEA porteranno a viti più resistenti alle avversità (pagine 23-25)**

Bertini et al. (2019) - *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138: 239

Pessina et al. (2016) - *Horticulture Research*, 3.

Possamai et al. (2020) - *Plants*, 9: 781.

Royo et al. (2018) - *Plant Physiology*, 177: 1234.

### **Grazie alle TEA la frutticoltura può essere 2.0 (pagine 26-27)**

Pompili V. et al. (2020) - *Plant Biotechnology Journal*, 18: 845.

### **Anche gli agrumi in corsa verso le TEA**

### **(pagine 28-30)**

Jia H. et al. (2017) - *Plant Biotechnology Journal*, 15: 817.

Lo Piero A.R. (2020) - *Abiotic stress resistance in The Citrus genome*, 225Ed. Springer.

Poles L. et al. (2020) - *Plants*, 9: 938.

Slonia F. et al. (2020) - *Frontiers in Plant Science*, 11: 1.

### **Lo stato delle TEA nella ricerca (pagine 31-34)**

Parisi C. et al. (2021) - EUR 30589 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-76-30206-3.

Singer S.D. et al. (2021) - *Critical Reviews in Plant Sciences*, DOI: 10.1080/07352689.2021.1883826.

*Nature Biotechnology* (2013) 31, Vol. 8 (August).

