

# creafuturo

le sfide della ricerca agroalimentare

TESTATA GIORNALISTICA ONLINE DEL CREA, ISCRIZIONE N. 76/2020 AL REGISTRO STAMPA DEL TRIBUNALE DI ROMA DEL 29/7/2020



## Pianeta Te(rr)a





# Indice



**Direttrice Responsabile** Cristina Giannetti  
**Caporedattrice** Micaela Conterio  
**In redazione**  
Giuseppina Crisponi, Giulio Viggiani  
**Segreteria di redazione** Alexia Giovannetti  
**Impaginazione** Alberto Marchi  
**Foto** CREA / Adobe Stock  
**Foto editor** Francesco Ambrosini  
**Registrazione** Testata giornalistica online del CREA - Tribunale di Roma  
Iscrizione n. 76/2020 del 29 luglio 2020  
**Informazioni** stampa@crea.gov.it  
**Web** <https://creafuturo.crea.gov.it/>  
**Copyright** Tutto il materiale scritto dalla redazione è disponibile sotto la licenza Creative Commons Attribuzione 4.0 Internazionale - Non commerciale - Condividi allo stesso modo: significa che può essere riprodotto a patto di citare CREA Futuro, di non usarlo per fini commerciali e di condividerlo con la stessa licenza. Per questioni di diritti, non possiamo applicare questa licenza alle foto.



**Amministrazione e sede legale**  
CREA - Via della Navicella, 2 - 00184 Roma  
**Redazione**  
CREA - Via Barberini, 36 - 00187 Roma  
**N.7 chiuso in redazione** alle ore 19:00  
di venerdì 26 Maggio 2023

- 3** **Tecnologie di Evoluzione Assistita: l'excalibur per le**  
Carlo Gaudio
- 8** **PIANETA TE(rr)A!**  
Cristina Giannetti
- 10** **Una nuova epoca per l'agricoltura italiana**  
D'Orso / Palma / Possenti
- 13** **Difesa della Pianta: l'ultima frontiera**  
Ilardi / Roversi
- 24** **Agricoltura & Ambiente: l'impatto. Intervista a Giuseppe Corti**  
Micaela Conterio
- 27** **TEA in frutticoltura: istruzioni per l'uso**  
Ciacciulli / Licciardello
- 32** **La filiera agroalimentare per le TEA: ecco il position paper**  
Mauro Fontana
- 35** **Frumento: tra nutrizione e resistenza alle malattie**  
Marone / Pecchioni
- 39** **Riso: nuovi orizzonti della ricerca**  
Vaccino / Sansoni / Bianchi / Pecchioni
- 44** **Vite: il primato italiano**  
Nerva / Velasco / Chitarra
- 50** **Olivo: la scommessa sulle varietà "migliori"**  
Zelasco / Perri / Viggiani
- 57** **Pomodoro: il futuro è già qui**  
D'Orso / Nicolìa / Sestili
- 61** **Melanzana: senza semi, prima di tutto**  
Rotino / Toppino / Tassone
- 65** **Giù le mani dal Pesto: il caso del Basilico Genovese Dop**  
Laura / Savona
- 67** **Agrumi: stessa identità, nuove qualità**  
Ciacciulli / Licciardello
- 72** **Agrumi: per le malattie è corsa contro il tempo**  
Ciacciulli / Licciardello
- 78** **Fragola: quella del desiderio è rifiorire**  
Verde / Sabbadini / Pietrella
- 82** **Drupacee: una sfida vinta a metà**  
Micali / Monticelli / Vendramin
- 87** **Kiwi: la difesa prima di tutto**  
Michelotti / Caboni / Tacconi
- 92** **La canapa: mille varietà per mille usi**  
Bassolino / Paris / Righetti / Terracciano
- 98** **Pioppo: la pianta modello di qualità**  
Carra / Biselli / Fricano / Nervo
- 106** **Animali: tutta un'altra cosa**  
Crisà / Marchitelli
- 111** **TEA in pratica: l'innovazione multi-attore della PAC**  
Cristiano / Carta / Bonfiglio
- 116** **Non c'è futuro senza ricerca (... e sperimentazione in campo)**  
D'Orso / Palma / Possenti
- 118** **Federica: i prodotti ottenuti con le TEA sono uguali ai prodotti ottenuti "tradizionalmente"?** Risponde Marina Carcea
- 119** **TEA (tecnologie di evoluzione assistita) & Co: un'analisi del sentimento nei media** Vassallo / Gabrieli

## Tecnologie di Evoluzione Assistita: l'excalibur per le sfide dell'agroalimentare?

Di Carlo Gaudio



### Come accrescere le produzioni nel Terzo Millennio, consumando di meno

La pratica di selezionare colture ed allevamenti con proprietà genetiche particolari risale agli albori della nostra civiltà, quando, circa dodicimila anni fa, in Medio Oriente, si venivano a formare le prime comunità umane stanziali, capaci di coltivare le piante utili a nutrirsi. Tuttavia, solo nel secondo dopoguerra del XX secolo (anni '70), la tecnologia faceva un salto sensibile, riuscendo a cambiare profondamente le tradizionali colture, modificandone il patrimonio genetico, mediante l'introduzione di geni provenienti da altre specie, ottenendo degli organismi geneticamente modificati (OGM). Una normativa europea sugli OGM veniva introdotta sin dall'inizio degli anni '90, per proteggere la salute dei cittadini e l'ambiente. Ad oggi, in Italia, è vietato l'utilizzo degli OGM nella produzione agricola, nell'allevamento zootecnico (tranne che per l'utilizzo di farmaci di origine biotecnologica) e nella trasformazione alimentare.

A partire dagli anni 2000 – a seguito del brillante studio che ha portato all'attribuzione del premio Nobel per la chimica a due donne: le ricercatrici Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier – si sono sviluppate le nuove tecniche genomiche (NGT) tra le quali l'*editing* del genoma, la cisgenesi, l'intragenesi, l'RNA interferente e il *reverse breeding*, gruppo di tecniche afferenti alla grande famiglia delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA). Tutte queste tecniche hanno reso possibile restringere il campo d'azione solamente ai geni di interesse o a singole basi del DNA genetico della coltura stessa (dunque senza immissione di geni "estranei"), ottenendo – in maniera molto più rapida e precisa – risultati che sono, di fatto, l'evoluzione moderna di ciò che si sarebbe ottenuto per mutazione spontanea o per incrocio e, dunque, privi di effetti indesiderati.





## Le nuove sfide del settore agricolo

In un mondo che, dal gennaio di quest'anno ha superato gli 8 miliardi di abitanti, le sfide che il settore agricolo è chiamato ad affrontare in tema di sostenibilità produttiva ed ambientale – anche alla luce del *Green Deal* europeo e delle strategie "*From farm to fork*" e "Biodiversità" – impongono la ricerca di nuove tecniche e di metodi di coltivazione finalizzati al miglioramento genetico delle piante, al fine di renderle più resistenti alle infezioni da parassiti, meno bisognose di prodotti fitosanitari e in grado di minimizzare l'utilizzo delle risorse idriche e dei fertilizzanti. "**Produrre di più con meno**" è dunque la scommessa chiave del futuro, anche in termini di sostenibilità economica per le imprese del settore.

A fronte di tali decisive sfide – ed in considerazione del consolidato cambiamento climatico in grado di arrecare potenziali danni irreversibili all'agricoltura ed ai sistemi agroalimentari – l'applicazione in campo agricolo delle TEA si rivela oggi forse l'unica preziosa risorsa in grado di riscrivere le regole del *breeding* vegetale, al servizio di una produzione ambientalmente più sostenibile ed economicamente più vantaggiosa, senza comportare particolari rischi. Infatti, mentre gli OGM prevedono l'inserimento nel genoma originario di sequenze di geni di altre specie di piante o anche di animali – introducendo cioè DNA estraneo e creando così **organismi transgenici** – le TEA consentono la modifica del genoma, ma senza inserimento di geni "estranei", provenienti cioè da altre specie, con il risultato finale di costituire degli **organismi cisgenici**.

## Le TEA: editing del genoma e cisgenesi

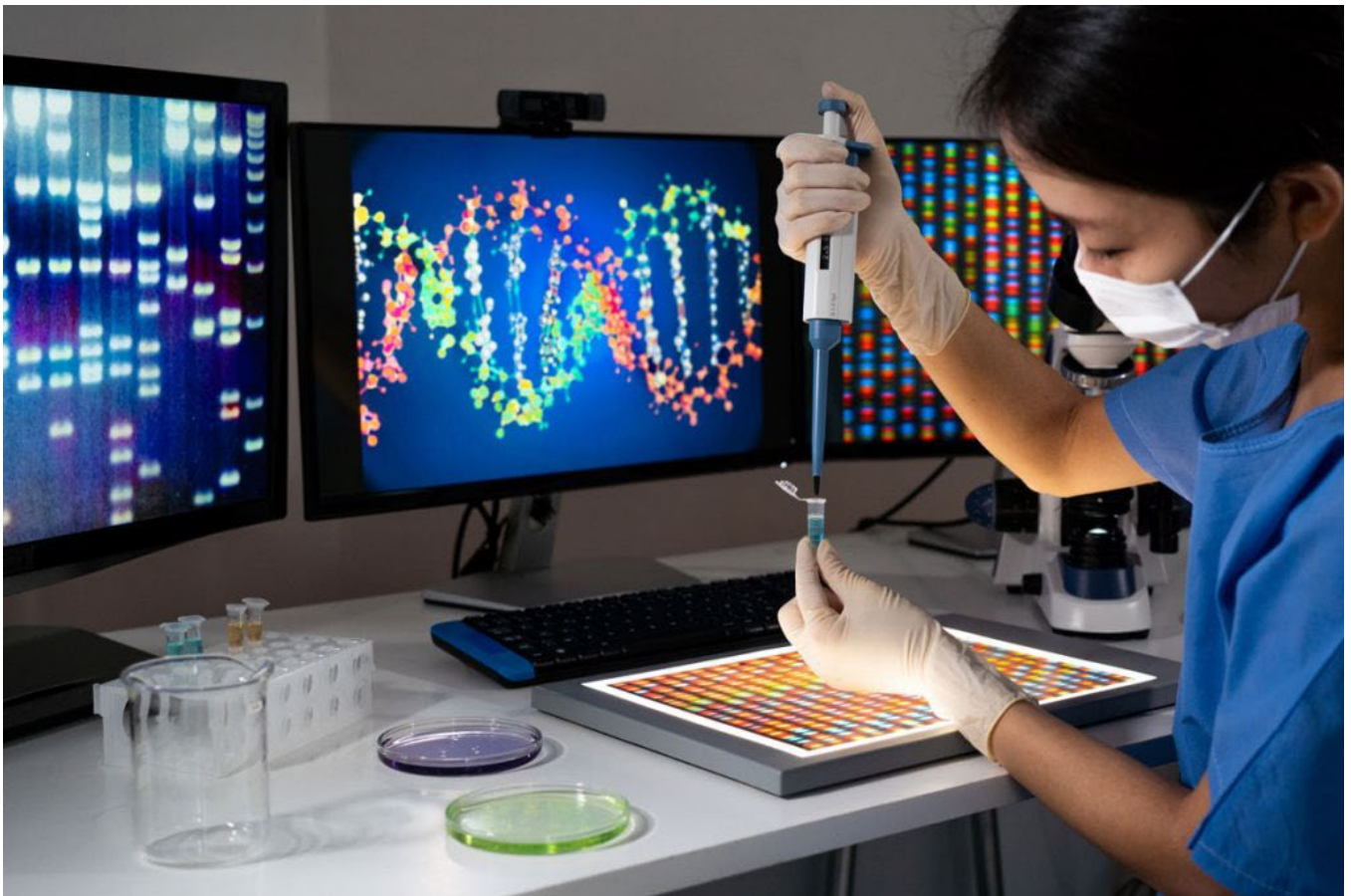
La grande innovazione delle TEA è costituita dalla tecnica del *genome editing*, cioè dalla possibilità di modificare il genoma, conseguente alla scoperta del sistema CRISPR. La tecnica di *editing* del genoma più nota è denominata infatti CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats /Cas* = Brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari /associate), in quanto utilizza proprio la proteina Cas9. Tale tecnica è stata scoperta nel 2012 da Emmanuelle Charpentier e Jennifer Doudna, vincitrici del Premio Nobel per la chimica nel 2020.



Mediante **l'editing del genoma** si può introdurre in una varietà di specie coltivata una qualsiasi mutazione favorevole, senza inserire geni "estranei" ed evitando le tradizionali, lunghe pratiche di incrocio e di reincrocio: l'unica mutazione introdotta è solo quella che si desidera ottenere. Le coltivazioni modificate con **l'editing del genoma** prevedono, infatti, alterazioni "chirurgiche" del DNA della pianta, ottenute con tecniche di estrema precisione, che consentono di modificare, aggiungere o rimuovere porzioni di genoma nei soli punti desiderati: tale tecnica si sfrutta, ad esempio, per mettere a tacere alcuni geni, che rendono una pianta vulnerabile alla siccità o ad una certa malattia.

La mutagenesi casuale consiste nell'accelerare il ritmo delle mutazioni genetiche spontanee degli organismi viventi. Si tratta di piccole modifiche operate solo all'interno del patrimonio genetico della specie, che permettono di ottenere in pochi mesi in laboratorio varietà selezionate di piante: le stesse che sarebbe stato possibile ottenere in molti anni, incrociando piante soggette a mutazioni genetiche naturali, selezionate in base alle caratteristiche più desiderabili, così come fanno gli agricoltori da millenni. Così, la **cisgenesi** – che a differenza della transgenesi introduce solo geni nativi- produrrà un organismo simile a quello che si otterrebbe con l'incrocio, avendo però il vantaggio di consentire una drastica riduzione dei tempi necessari per giungere alla varietà desiderata. In virtù di questa peculiarità, essa non è considerata potenzialmente rischiosa né per la salute umana e animale, né per l'ambiente.

È utile nuovamente sottolineare che le varietà ottenute attraverso la **cisgenesi**, non sono, tecnicamente, OGM (regolati dalla Direttiva 2001/18/CE) e risultano, inoltre, indistinguibili, analiticamente, dai corrispondenti organismi non cisgenici.



## Il quadro normativo

Sul versante normativo, il Parlamento europeo, con la risoluzione del 25.02.2014, si era espresso a favore delle nuove tecnologie genomiche ed aveva biasimato il ritardo della Commissione nel chiarire il loro stato giuridico, ribadendo tale preoccupazione nella risoluzione dell'11.03.2014: "*Il futuro del settore ortofrutticolo – Strategie per la crescita*". Nel luglio del 2018, una decisione della Corte di Giustizia Europea aveva però assimilato le nuove tecniche di miglioramento genetico agli Ogm (rendendole soggette alle regole dettate dalla Direttiva 18/2001/CE) ed impedendo conseguentemente il loro utilizzo in campo nei Paesi dell'Unione Europea. Tuttavia, la comunità scientifica continuava (e continua) a chiedere di esentare le TEA dall'applicazione della normativa 18/2001, in quanto **a differenza della transgenesi, la mutagenesi è un insieme di tecniche che consentono di modificare il genoma senza inserire DNA estraneo**. Nei prossimi mesi è attesa una proposta della Commissione Europea di revisione della direttiva 18/2001 ed una recente pronuncia della Corte di Giustizia Europea (nella causa C-688/2, pubblicata il 7 febbraio scorso) – pur molto articolata ed a tratti contraddittoria – sembra far intravedere dei sostanziali cambiamenti, che potrebbero domani aprire alla produzione di colture rese resistenti dalle TEA. Nel mondo, già diversi Paesi – Stati Uniti, Canada, Sudamerica, Giappone, Regno Unito – hanno liberalizzato l'uso delle TEA in campo e, dunque, per l'Europa e per l'Italia, verrebbe a ridursi drammaticamente la competitività dell'agricoltura nel contesto internazionale. Per di più, alcuni Paesi europei – come Belgio, Svezia e Spagna – con propria legislazione, hanno iniziato la sperimentazione in campo di colture ottenute con le TEA.

## La ricerca e sperimentazione del CREA

La nostra agricoltura deve oggi fronteggiare sfide epocali, quali i cambiamenti climatici, nel quadro degli obiettivi del *Green Deal* europeo, come la forte e rapida riduzione dell'uso dei fitofarmaci e dei fertilizzanti. Per vincerle, servono nuove varietà di piante, in grado di assicurare al contempo produttività, resilienza e sostenibilità ambientale, garantendo altresì quella qualità e tipicità che hanno reso il nostro *Made in Italy* agroalimentare riconoscibile ed ammirato sui mercati di tutto il mondo.

In questo contesto, il miglioramento genetico con le TEA diventa un obiettivo strategico dell'agricoltura del nostro Paese, per poter produrre nuove varietà, più adatte alle diverse condizioni climatiche, con tratti qualitativi innovativi, resistenti agli agenti nocivi biotici ed abiotici, alle vecchie e nuove patologie, capaci di utilizzare in modo più efficiente e sostenibile l'acqua e gli elementi nutritivi disponibili. Per raggiungere questo obiettivo, oggi fondamentale ed irrinunciabile, occorre una ricerca avanzata, basata su tecnologie di miglioramento genetico all'avanguardia.

Il CREA è convinto che la scommessa con il futuro può e deve essere vinta, ma necessita di un forte investimento in ricerca: oggi, in particolare, in quella genomica e biotecnologica. I ricercatori del CREA hanno da tempo posto la loro attenzione sulle potenzialità di queste nuove tecnologie, sia per motivi squisitamente scientifici, che per saggiarne tutte le potenzialità operative. Conoscere a fondo una nuova tecnologia significa padroneggiarla, capirla, tracciarla, anche per poterne prevenire potenziali rischi ed eventuali azioni fraudolente.

I centri di ricerca del CREA potranno applicare le nuove biotecnologie, al fine di innalzare la qualità vegetativa e produttiva delle piante, nonché la loro sostenibilità ambientale.





Il CREA ha già accumulato una notevole esperienza nel settore: negli ultimi 5 anni ha coordinato **il progetto BIOTECH** – un investimento da 6 milioni di euro – finalizzato soprattutto all'applicazione delle Tecniche di Evoluzione Assistita all'agricoltura italiana. BIOTECH ha sviluppato **un know-how diffuso** mediante oltre 25 laboratori di ricerca dedicati a sviluppare le TEA su circa 15 specie diverse. Grazie a BIOTECH l'Italia potrà affrontare l'auspicata apertura europea alle TEA, con importanti conoscenze scientifiche consolidate e significativi risultati già potenzialmente testabili in campo. Tra i casi più interessanti c'è quello dei pomodori resistenti alla germinazione delle piante parassite, del frumento duro non attaccabile dalle malattie fungine e – in termini di qualità – le uve e le melanzane senza semi o le arance arricchite di sostanze antiossidanti. Ancora, sono da citare i risultati ottenuti sulle viti, per le quali viene utilizzata quasi la metà dei fungicidi impiegati in Europa, al fine di difenderne le colture. Le viti resistenti a oidio sono infatti facilmente ottenibili attraverso il *genome editing*, agendo sul gene MLO. E ci sono vari geni di resistenza alla peronospora, che possono essere trasferiti dalla vite selvatica a quella coltivata attraverso cisgenesi, tutti ambiti nei quali si potrebbe velocemente intervenire all'indomani delle attese modifiche normative, che consentiranno **la traslazione della sperimentazione dal laboratorio al campo**.

## Conclusioni

Negli ultimi venti anni, la Scienza ha compiuto straordinari progressi nella tecnica genomica, nel rigoroso rispetto delle caratteristiche della specie interessata, e tuttavia in alcuni Paesi la legislazione è rimasta pressoché immutata.

Nelle more dell'adozione di una nuova normativa UE in materia di produzione di colture mediante l'applicazione delle TEA, è indispensabile che il nostro Paese assuma un'iniziativa nazionale per consentire l'avvio della sperimentazione in campo degli organismi ottenuti dalle tecniche di evoluzione assistita. Oggi, infatti, il nostro Paese è normativamente frenato: non è attualmente consentita la sperimentazione in campo e le piante ottenute con le TEA non possono uscire dai laboratori. Recentemente, è stata presentata nel nostro Parlamento una norma di legge finalizzata a rimuovere questo blocco nella sperimentazione, per far sì che l'Italia non rimanga indietro agli altri Paesi, né dal punto di vista legislativo né da quello scientifico.

Tale novità normativa è tanto più urgente ed indispensabile in quanto l'immissione in commercio dei prodotti ottenuti tramite l'*editing* del genoma richiede anni di ricerca e sperimentazione, attività propedeutiche indispensabili per poter giungere poi a produrre e a commercializzare i prodotti.

Il grande letterato irlandese George Bernard Shaw, vincitore sia del premio Oscar che del Nobel, ammoniva: "*Dio ci ha regalato un Mondo che solo la nostra follia ci impedisce di trasformare in Paradiso*". Facciamo sì che – anche con l'impegno dello studio e della ricerca – quella previsione non si avveri!

# INVITO ALLA LETTURA

## PIANETA TE(rr)A!

Di Cristina Giannetti



Se dal pianeta Terra giungono sempre più frequenti e preoccupanti notizie di raccolti perduti, alluvioni, siccità e suoli degradati, abbiamo pensato, per tornare ad avere fiducia nel futuro, di spostarci su un altro pianeta, quello dello delle TEA (le tecniche di Evoluzione Assistita) o new breeding techniques che dir si voglia. Si tratta delle nuove conoscenze messe a punto dalla ricerca, in grado di far dialogare natura e scienza, di migliorare il patrimonio genetico senza utilizzare specie estranee e di farlo in tempi sorprendentemente rapidi e non paragonabili a quelli necessari per gli incroci tradizionali. Da queste sono derivate e stanno derivando piante più resilienti al cambiamento climatico, capaci di sopravvivere con poca acqua, in climi estremi e terreni degradati e poco fertili, resistenti alle malattie e ai parassiti e con più elevate qualità nutrizionali ed organolettiche.

In questo numero, capiremo lo stato dell'arte (con un occhio particolare, naturalmente, al CREA) di queste tecniche innovative – in Italia e nel mondo – e le loro prospettive, a partire dal consueto [editoriale](#) del presidente CREA Carlo Gaudio, che, come sempre, ci restituisce il quadro d'insieme, tra avanzamento delle conoscenze e impegno delle Istituzioni. E, a questo proposito, ospitiamo il [contributo](#) del presidente del cluster CLAN (associazione di stakeholders dell'agroalimentare), che ha recentemente pubblicato un position paper per ribadire l'importanza delle TEA per la nostra agricoltura.

Con l'aiuto dei nostri ricercatori, invece, facciamo il punto scientifico, prima, vedendo "da vicino" come [funzionano](#), poi dedicando due focus ad applicazioni specifiche come quelle finalizzate alla [difesa delle](#)



[piante](#) da malattie e patogeni e alla [frutticoltura](#). Abbiamo anche provato ad immaginare [l'impatto](#) delle TEA su risorse come acqua e suolo, sull'ambiente e sulle pratiche agronomiche.

Nella sezione Tea al Centro "@CREA & TEA" scopriamo, prodotto per prodotto, a che punto è la ricerca e a cosa stanno lavorando i nostri Centri. La lista è davvero lunga, dalle colture base della nostra alimentazione – [frumento](#), [riso](#), [vite](#), [olivo](#) – ai vegetali simbolo della dieta mediterranea – [pomodoro](#), [basilico](#), [melanzana](#) – fino alla frutta – [drupacee](#) (cioè pesche, albicocche e ciliegie), [fragole](#), agrumi (sia sotto il profilo della [qualità](#), sia sotto quello della [difesa dalle malattie](#)), [kiwi](#). Ma l'elenco si allunga anche per la parte non food, perchè si studiano le Tea anche per piante come il [pioppo](#) e la [canapa](#). Un ragionamento a parte merita l'editing genomico applicato agli [animali d'allevamento](#): qui la strada da fare è ancora lunga.

E ancora, le nostre rubriche.

[CREAIncontra](#) ha chiesto all' on. Raffaele Nevi, segretario Commissione Agricoltura della Camera dei deputati, da sempre in prima linea per far diventare le TEA una reale possibilità per l'agricoltura italiana, perché sono importanti, qual è il contributo della ricerca (e del CREA) e, infine, qual è impegno delle Istituzioni in questa direzione.

Il podcast "[Storie di Ricerca](#)" ripercorre l'evoluzione scientifica del miglioramento genetico in agricoltura, una storia emozionante, con tante pagine ancora tutte da scrivere.

In "[Uno sguardo al Futuro](#)", vedremo come la ricerca, in realtà, abbia ben chiara la portata dirompente di queste nuove tecniche. Serve però un adeguamento legislativo che permetta la sperimentazione in campo, passaggio obbligato per portare i prodotti migliorati sul mercato.

["Chiedilo al CREA"](#) risponde alla lettrice che vorrebbe sapere se i prodotti ottenuti con TEA sono uguali a quelli convenzionali.

["CREA per la scuola"](#) ci racconta del Corso Cerletti-CREA di "Tecnico specializzato in pratiche innovative ed ecosostenibili per la gestione dell'agroecosistema vigneto", un percorso di alta formazione della Regione Veneto per preparare giovani tecnici della viticoltura e accompagnarli all'assunzione a tempo indeterminato. Obiettivo: una nuova generazione formata per utilizzare tutte le più avanzate conoscenze per una viticoltura sempre più sostenibile e d'eccellenza.

Per "[Presi nella rete](#)", il consueto appuntamento con la Rete Rurale, abbiamo approfondito le TEA dal punto di vista "pratico" delle aziende, con gli strumenti dell'innovazione multiattoriale previsti dalla PAC.

["Dal CREA con sentiment\(o\)"](#), invece, ha interrogato, come di consueto, i social sul tema. Pur risultando al centro del dibattito scientifico e politico e toccando vari ambiti dell'agroalimentare e dell'agricoltura, resta ancora un argomento per addetti ai lavori, guardato con prudenza, se non con perplessità, da tutti gli altri, anche a causa di una strisciante e crescente disinformazione

Infine, i video di CREABreak: per farvi scoprire con i nostri ricercatori, tante altre storie di innovazione direttamente da [Biotech](#), il più importante progetto di ricerca pubblica finora mai realizzato sulle biotecnologie in agricoltura. Dai [trucchi salva acqua](#) delle piante alle meraviglie genetiche dell'[orzo](#), highlander per definizione, dal genome editing mostrato ed eseguito come una [ricetta](#) all'[intervista doppia](#) per far capire somiglianze e differenze tra miglioramento genetico classico e biotech, il nostro palinsesto è davvero molto ricco.

E, dal pianeta TE(rr)A, per stavolta è tutto...

Buona lettura, visione, ascolto

## Una nuova epoca per l'agricoltura italiana

Di D'Orso / Palma / Possenti



Ultima frontiera del miglioramento genetico delle piante coltivate, le TEA (Tecnologie di Evoluzione Assistita) sono uno strumento potente per rendere l'agricoltura più sostenibile, limitando l'uso di fitofarmaci, migliorando il valore nutrizionale degli alimenti e assicurando la produzione agricola. Includono fondamentalmente due metodiche, la cisgenesi e il genome editing, in grado di riprodurre l'evoluzione naturale, dandole l'accelerazione necessaria per stare al passo con l'incredibile velocità dei cambiamenti climatici. Cosa sta facendo la ricerca, in particolare quella del CREA?

Le New Breeding Techniques, in Italia note come Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) rappresentano l'ultima frontiera del miglioramento genetico delle piante coltivate ed includono fondamentalmente due metodiche: la cisgenesi e il *genome editing*. Si tratta di moderne biotecnologie che, con una operazione estremamente specifica di "taglia e cuci" del DNA, sono in grado di inserire una mutazione all'interno del gene di interesse dell'organismo che si vuole modificare.

In ogni specie vegetale, i geni che compongono il genoma possono essere presenti in forme leggermente diverse (varianti geniche) tra le sottopopolazioni della stessa specie: queste diverse "versioni" del gene, pur condividendo la stessa funzione specifica, possono conferire caratteristiche leggermente diverse all'individuo che le esprime. Un esempio tra tutti è la variabilità di forma e colore del frutto, che si può trovare nelle diverse varietà di pomodoro coltivato. Con le TEA diventa possibile introdurre varianti su geni specifici allo scopo di migliorare le varietà esistenti, nell'ottica di ottenere prodotti agroalimentari maggiormente sostenibili per l'ambiente, più produttivi, con migliorate qualità nutrizionali, resistenti ai parassiti o più tolleranti ai cambiamenti climatici, risultando quindi vantaggiosi per l'agricoltore e il consumatore.



## Cisgenesi e genome editing: somiglianze e differenze

È importante sottolineare che, alla fine del processo di miglioramento, il genoma della pianta ottenuta con le TEA non contiene alcun gene che conferisce resistenza ad antibiotici o erbicidi, né frammenti di DNA esogeno, a differenza dei più classici OGM (Organismi Geneticamente Modificati), ottenuti con l'introduzione di geni di specie estranee negli organismi di interesse (transgenesi).

In particolare, con la **cisgenesi** è possibile introdurre, nei genomi delle piante di interesse, varianti geniche provenienti dalla stessa specie o da specie sessualmente compatibili; i geni trasferiti mantengono le stesse caratteristiche strutturali e di orientamento della pianta di provenienza, conservando quindi le informazioni genetiche su come, dove e quando il cisgene deve essere espresso. **Si potrebbe ottenere lo stesso risultato attraverso l'incrocio classico, ma con tempi di selezione della nuova varietà molto più lunghi e con un grado di precisione nettamente più basso.** Infatti, con l'incrocio normalmente si inseriscono, oltre al gene di interesse, anche altri geni posizionati nelle sue vicinanze e ad esso ancorati, mentre, al contrario, con la cisgenesi solo e soltanto il gene prescelto viene veicolato e inserito nel genoma della pianta.

Il **genome editing** invece è una metodica di mutagenesi sito-diretta in grado di indurre mutazioni estremamente specifiche sul gene prescelto. I geni così mutati possono acquisire, perdere o modificare la loro funzione, conferendo alla pianta nuove proprietà e portando quindi ad un incremento della biodiversità agricola.

Le mutazioni generate attraverso *genome editing* sono indistinguibili da quelle che spontaneamente avvengono in natura o che vengono indotte con metodi chimici o fisici (utilizzate sin dalla metà del XX secolo). Gli eventi di mutazione naturale sono casuali e non controllabili, ossia non è possibile a priori determinare su quale gene o porzione di esso avvengano e, soprattutto, non è possibile prevederne la frequenza. Inoltre, ci possono volere millenni per l'insorgenza di mutazioni spontanee che determinino la comparsa di caratteri utili per la pianta coltivata di interesse.

Al contrario, le mutazioni puntiformi create con il *genome editing*, sono mirate in un punto preciso -conosciuto a priori per l'effetto che produce la modifica sulla pianta – e controllate a posteriori dopo la mutagenesi, mediante analisi molecolari.

## CRISPR/Cas: le forbici molecolari

La tecnica del *genome editing* più utilizzata è quella del CRISPR/Cas. Il nome sembra uno scioglilingua, ma non è altro che una naturale strategia di difesa batterica contro le infezioni virali. Questo sistema si basa sulla **capacità di un particolare enzima isolato in un batterio, la nucleasi Cas, di tagliare il DNA in maniera specifica.** Questo taglio permette al batterio di degradare il DNA del virus che lo ha infettato e quindi di proteggersi dall'infezione. La più peculiare caratteristica di questo enzima è la sua programmabilità, grazie alla quale ha fatto diventare le tecniche basate sul CRISPR lo strumento di **"chirurgia molecolare del DNA"** più potente al momento disponibile. Infatti, dando delle specifiche istruzioni (sotto forma di RNA guida), la nucleasi può essere indirizzata verso lo specifico gene che si vuole modificare, in modo che venga tagliato nel punto riconosciuto dalla guida. Sfruttando poi il normale sistema di riparo del DNA presente nelle cellule, il taglio viene riparato. Molto spesso nella fase di riparazione della regione tagliata



si generano errori casuali nella sequenza di DNA, ovvero si creano mutazioni proprio nel sito riconosciuto dal complesso Cas-guida.

La nucleasi più utilizzata nel sistema CRISPR è la Cas9; tuttavia, negli ultimi anni si è assistito ad una continua evoluzione delle tecnologie CRISPR, in parte grazie alla disponibilità di innumerevoli varianti naturali o artificiali delle nucleasi Cas, con caratteristiche diverse, che consentono di essere talvolta più efficaci, talvolta più specifiche, oppure di raggiungere siti del genoma altrimenti inaccessibili. In aggiunta, più recentemente sono emerse nuove tecnologie basate su CRISPR molto sofisticate, come **il Prime Editing, il Base Editing o il Gene-Targeting**, che riescono ad introdurre nel sito specifico mutazioni predeterminate, generando così delle nuove varianti geniche "su misura". Per questo al **CREA Genomica e Bioinformatica (CREA GB)**, oltre ad applicare le metodiche CRISPR più convenzionali con diverse nucleasi, stiamo anche **sperimentando con successo il Prime Editing e il Gene-Targeting**. Inoltre, sono in fase di messa a punto protocolli per il **Base Editing** e, nell'ambito di una collaborazione con altri Enti di ricerca, stiamo **valutando le performance di nuove nucleasi Cas di recente scoperta, finora mai impiegate per l'editing nelle piante**.

## Qualche esempio

Con le TEA, in particolare con l'incredibile varietà di strumenti molecolari del CRISPR a disposizione della comunità scientifica, si è ormai aperta una nuova epoca "Biotech" per il miglioramento genetico delle piante. Sono molti le applicazioni delle TEA presenti nella letteratura scientifica: a partire da **piante di grano le cui cariossidi** attraverso inattivazione genica **sono state arricchite in ferro e zinco**, per ridurre l'accumulo di acido fitico, che inibisce l'assorbimento intestinale di alcuni minerali, tra questi proprio ferro e zinco. Inoltre, diversi **frutti e cereali sono stati arricchiti in provitamina A** mediante CRISPR, tra questi riso, banana, melone e pomodoro.

Molto importanti sono anche lo studio e la elaborazione di varietà maggiormente resistenti agli organismi patogeni: tra queste è stata ottenuta una **varietà di grano resistente all'oidio**, una parassitosi determinata da funghi *Ascomycota*. Grazie alla tecnica CRISPR è stato inattivato il gene che rende le piante maggiormente sensibili alla malattia e, dal momento che l'oidio **attacca circa 10.000 specie vegetali**, questa scoperta potrà avere importanti implicazioni per molte altre piante.

Al CREA GB, principalmente nell'ambito dei progetti BIOTECH (MASAF), AGRITECH (PNRR) e SMART-BREED (Regione Lazio), le TEA sono il fulcro dell'attività scientifica, sia fondamentale che applicata, finalizzata al miglioramento genetico di diverse specie. In particolare, l'attività in **pomodoro** ha recentemente portato alla realizzazione di una linea che **accumula provitamina D** (importante per la salute delle ossa e del sistema immunitario) rappresenta un esempio semplice, però di grande impatto, di come un intervento genetico "chirurgico" possa creare piante biofortificate, in grado di contrastare carenze nutrizionali. Ma si sta lavorando, in collaborazione con il CNR, anche a **piante di pomodoro e lattuga in cui è cambiato il tempo di fioritura, oppure modificata l'architettura in risposta ai cambiamenti ambientali, e che siano in grado di sviluppare una accentuata resilienza alla carenza idrica**.

Questa è solo la punta dell'iceberg, molti altri laboratori del CREA sono al lavoro con le TEA su numerose specie ortive, cerealicole, floricole, aromatiche ed arboree, per lo sviluppo di varietà resistenti all'attacco di patogeni e a stress abiotici o con caratteristiche qualitative migliorate.



# Difesa della Pianta: l'ultima frontiera

Di Ilardi / Roversi



## Le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) per l'ottenimento di piante resistenti a Patogeni

Agenti nocivi, cambiamenti climatici e introduzione accidentale di patogeni dannosi per le nostre colture causano un'ingente perdita di produttività. Per ottenere piante resistenti a patogeni e fitofagi, non si può, quindi, prescindere dalla conoscenza delle specie dannose, della loro interazione con le piante ospiti e con i fattori di controllo. In tale direzione, negli ultimi dieci anni, con l'avvento delle Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA), che comprendono l'editing del genoma e la cisgenesi, si è aperta una nuova frontiera per il miglioramento genetico delle specie vegetali indirizzate allo sviluppo di piante resistenti. Scopriamo le attività di Difesa e Certificazione, l'Istituto Nazionale di Riferimento per la Difesa delle Pianta

## Premessa

In una recente analisi, condotta a livello mondiale sulle cinque principali specie di piante ad uso alimentare (grano, riso, mais, patata e soia), la **perdita di produttività causata dagli agenti nocivi è stata stimata tra il 20 e il 40%.**

Uno scenario che si complica ulteriormente se si considerano le sempre più pressanti ricadute sui sistemi agricoli e più in generale sull'ambiente, dei cambiamenti climatici in atto, i cui effetti finali sono ancora in gran parte da comprendere, non solo per quanto attiene le azioni dirette sulle componenti vegetali, ma anche,

in particolare, per l'influenza sulle comunità di organismi epigei (ndr. Parte aerea della pianta) ed ipogei (ndr. parte sotterranea della pianta) nocivi alle piante. Inoltre, ulteriori complicazioni derivano dall'intensificarsi di eventi meteorici estremi e dalla crescita esponenziale di introduzioni accidentali di virus, batteri, funghi, insetti, nematodi e acari alieni, dannosi alle nostre colture e provenienti da altre aree geografiche (inevitabile conseguenza della globalizzazione), in molti casi in grado di svilupparsi in modo epidemico sulle nuove piante, favoriti dalla mancanza di fattori biotici di controllo.

Il raggiungimento degli obiettivi fissati dal regolamento (UE) 2021/2115 del Parlamento europeo e dalla politica agricola comune (PAC) rappresenta una sfida per il comparto agricolo italiano. Tra le varie azioni da intraprendere per ridurre l'impatto ambientale dei sistemi agricoli nazionali, migliorandone la produttività, riveste una notevole importanza lo sviluppo di nuove varietà resistenti agli organismi nocivi, per contribuire ad una drastica riduzione nell'utilizzo di fitofarmaci. Il recente rapporto ISPRA sulla presenza di questi contaminanti nelle acque nazionali, infatti, ha evidenziato per l'Italia ancora una volta l'importanza e l'urgenza di trovare soluzioni, che garantiscano la produttività degli agro-ecosistemi e, nel contempo assicurino la tutela della salute sia degli operatori agricoli che dei cittadini consumatori.

In tale quadro generale, si ritiene prioritario, quindi, rafforzare le sinergie delle principali istituzioni con specifiche competenze nel settore della Difesa delle Piante, a partire dall'indispensabile contributo di patologi vegetali e zoologi agrari e forestali, per sviluppare nuovi strumenti e strategie idonei a rispondere a tali richieste, in particolare con riferimento alla tutela e valorizzazione del germoplasma delle principali specie di interesse agrario coltivate nel nostro Paese.

**Per ottenere piante resistenti a patogeni e fitofagi, non si può, infatti, prescindere dalla conoscenza delle specie dannose in tutte le loro varianti, della loro fine interazione con le piante ospiti e con i fattori biotici di controllo, nonché da approfondite indagini epidemiologiche e di dinamica di popolazione.**

Negli ultimi dieci anni, con l'avvento delle Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA), che comprendono l'editing del genoma e la cisgenesi, si è aperta una nuova frontiera per il miglioramento genetico delle specie vegetali. In particolare, l'**editing del genoma**, basato sulle tecnologie CRISPR-Cas (per esempio *base editing* e *prime editing*) permette, non solo di inattivare un determinato gene (knockout – spegnere, eliminare), ma di introdurre in maniera mirata specifiche mutazioni. È ormai possibile trasferire nelle specie coltivate, in maniera diretta, mutazioni geniche associate a caratteri di resistenza, evitando l'introduzione, come avviene nel breeding classico, di caratteri indesiderati, accelerando così l'intero processo di sviluppo di varietà d'élite.

È importante sottolineare che **le mutazioni introdotte tramite le tecnologie di genome editing definite SDN-1 e SDN-2 dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e dalla Commissione Europea sono indistinguibili da quelle che si possono generare spontaneamente in natura. Le piante il cui genoma è stato editato tramite le tecniche SDN-1 e SDN-2 (piante GE) sono quindi assimilabili alle piante presenti in natura.** Si parla invece di **cisgenesi** quando il DNA, che porta il carattere desiderato, proviene esclusivamente dallo stesso "pool genico" della pianta ricevente. Allo stesso "pool genico" afferiscono tutte le specie, che possono incrociarsi con la pianta ricevente, mediante le tecniche di miglioramento genetico convenzionale.

**Le TEA sono state già applicate con successo a livello mondiale per lo sviluppo di piante resistenti ad agenti nocivi.** Tra le molteplici applicazioni vi è l'ottenimento di varietà di grano resistenti a Powdery mildew, (Oidio o Mal bianco del frumento) causato da *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* e a Fusarium Head Blight (FHB o fusariosi della spiga) causato principalmente dall'infezione di *F. graminearum* Schwabe, o di varietà di riso resistenti a Bacterial blight (Ruggine batterica) causato dal batterio gram-negativo *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*.



## Difesa da Patogeni delle Piante e Insetti Vettori associati: Studi sulla resistenza e TEA

A livello nazionale, le piante coltivate più rilevanti e caratteristiche del "made in Italy" includono vite, olivo, melo, pero, pesco, diversi agrumi, frumento tenero e duro, riso e pomodoro. Per queste specie è strategico anche intraprendere attività volte alla produzione di piante resistenti per contrastare direttamente le malattie, limitando l'uso di prodotti fitosanitari e la contaminazione da micotossine. Senza dimenticare che, tramite le tecniche TEA, potrebbe essere possibile recuperare degli ecotipi di particolare interesse qualitativo/storico, come, per esempio, il pomodoro San Marzano o il pomodoro di Corbara, la cui coltivazione è andata declinando, a causa dalla presenza di particolari malattie (es. la radice suberosa causata da *Pyrenochaeta lycopersici*).

Di seguito, con riferimento alle Tecniche di Evoluzione Assistita, si riportano brevi cenni su malattie delle piante presenti sul territorio nazionale, per le quali sarebbe opportuno l'ottenimento di resistenza, anche in considerazione del fatto in Italia e in Europa è vietato l'uso di antibiotici per le malattie causate da agenti batterici,

### Vite

A più di 60 anni dalle prime segnalazioni in Francia ed in Italia, la malattia della "Flavescenza dorata della vite" è ancora una delle patologie più gravi ed invalidanti di questa coltura. L'agente eziologico della flavescenza dorata (FD) è un fitoplasma (parassita delle piante *n.d.r.*), appartenente al gruppo dei gialumi della vite, che si insedia nei tessuti floematici (tessuti conduttori di una pianta) dell'ospite e ne provoca il blocco della linfa



elaborata, inducendo uno squilibrio delle attività fisiologiche della pianta stessa. La Flavescenza dorata si trasmette da una vite all'altra, principalmente attraverso un insetto vettore, lo *Scaphoideus titanus*, cicalina che vive prevalentemente sulla vite e può diffondere rapidamente la malattia, se non adeguatamente controllata. Il successo della lotta sta anche nell'attuazione di una strategia di difesa comprensoriale, promossa ogni anno dai diversi enti territoriali dove esiste il **problema Flavescenza dorata. La recrudescenza della malattia, che si sta osservando negli ultimi anni, è dovuta proprio alle difficoltà del controllo del vettore dovuto ad una minore disponibilità di principi attivi efficaci.** Sicuramente, quando la diffusione della malattia è ancora agli inizi, una pronta eradicazione delle piante infette e l'uso di trappole cromotropiche (a base cioè di particolari colori) può aiutare, ma, come detto, la mancanza di efficaci trattamenti insetticidi rende molto difficile il controllo. La possibilità di allevare le "storiche" varietà di vite, che hanno reso la nostra viticoltura ed enologia all'avanguardia mondiale, con caratteristiche di tolleranza/resistenza alla malattia potrebbe essere, unitamente allo sviluppo nel più breve tempo possibile di un programma di Lotta Biologica al principale insetto vettore, una soluzione strategica al problema.

Le principali malattie fungine della vite sono la cosiddetta peronospora della vite, causata da *Plasmopara viticola* e l'oidio, causato dal fungo *Erysiphe necator*. Il controllo di queste malattie su varietà tradizionali di *Vitis vinifera* richiede la regolare applicazione di fungicidi. È stato stimato che **nell'Unione Europea la viticoltura assorbe circa il 70% dei fungicidi utilizzati in agricoltura, la maggior parte dei quali per controllare gli agenti dell'oidio e della peronospora. La necessità di ridurre l'apporto di fitofarmaci dovuta ai costi elevati, all'insorgenza di resistenze dei patogeni ai fitofarmaci stessi, e agli impatti negativi sulla salute dell'uomo e sull'ambiente, richiede una valida alternativa che potrebbe essere basata in modo importante anche sulle nuove TEA.** La peronospora è oggi una delle più diffuse e pericolose malattie della vite in molte regioni europee ed italiane. I danni sulla vite da vino ad opera della peronospora

vengono essenzialmente legati alla defogliazione e alla perdita dell'intera produzione in grappoli. Introdotta in Europa nel 1878 dagli Stati Uniti, rappresenta da allora una continua sfida alla viticoltura per la quale sono stati utilizzati tutti i metodi di lotta possibili, ma che ancora causa danni ingenti alla coltura. **Sono state individuate diverse fonti di resistenza genetica, primo fra tutti il locus *Rpv3* che causa in foglie di vite una immunità mediata da effettori e necrosi, localizzata in risposta ad un ampio spettro di ceppi di *P. viticola*. In questo contesto, le TEA si possono avvalere di una ampia conoscenza delle basi genetiche della resistenza e contribuire in maniera determinante alla creazione di varietà resistenti.**

L'agente causale dell'**oidio** è il fungo *Erysiphe necator* ascomicete della famiglia *Erysiphaceae*, anche questo un parassita obbligato. Si tratta di un **fungo epifita, nel senso che invade superficialmente tutti gli organi verdi della pianta, infettandone solo le cellule epidermiche, causandone la morte.** Lo sviluppo superficiale delle strutture fungine forma una colonia visibile a occhio nudo come muffa polverulenta e biancastra. Questo potenziale distruttivo fa dell'oidio **una delle malattie più difficili da controllare.** È stato osservato che le proteine MLO diminuiscono la suscettibilità al mal bianco nelle specie modello di *Arabidopsis* e nelle piante di orzo e di pomodoro. Anche dalla vite sono state isolate sette sequenze VvMLO nel cDNA e sono state poi identificate come facenti parte di una famiglia di geni con 17 VvMLO, all'interno del genoma di *V. vinifera*. La disponibilità di geni di suscettibilità rappresenta una grande potenzialità per l'applicazione delle TEA, in particolare il genome editing, anche se la recalcitranza della specie alla rigenerazione ne ha frenato finora lo sviluppo.

## Olivo

***Xylella fastidiosa* è un batterio patogeno** che rappresenta un antico problema nelle Americhe. La prima segnalazione di una malattia causata da *X. Fastidiosa* risale alla fine del 1800 sulle viti in California, dove la malattia di Pierce ha avuto un impatto significativo sulla vitalità della vite. **In Italia dal 2013 ad oggi, il principale patogeno batterico dell'olivo è divenuto proprio *Xylella fastidiosa* subsp. *Pauca* (Xfp) associato alla "olive quick decline syndrome" (OQDS) nell'area del Salento.** L'inaspettata e impressionante progressione dell'epidemia di Xfp in Salento non solo ha avuto un impatto sulla produzione agricola e sul paesaggio, ma anche sul patrimonio culturale. I sintomi principali includono l'avvizzimento di foglie, ramoscelli e rami, spesso seguito dalla morte della pianta. Dopo la prima segnalazione nell'area di Gallipoli (provincia di Lecce), in accordo con la normativa europea che disciplina parassiti e patogeni da quarantena, la diffusione e la presenza di questo fitopatogeno è stata rilevata e monitorata. Finora, il batterio ha raggiunto la maggior parte degli uliveti della provincia di Lecce e alcune zone delle province di Taranto, Brindisi e Bari. **Si stima che circa 6.500.000 piante di olivo siano state colpite dalla malattia.** Xfp può sopravvivere anche in specie vegetali diverse dall'olivo anche selvatiche **e il principale vettore, una sputacchina, *Philaenus spumarius*, può diffondere il patogeno a distanze considerevoli, sia mediante diffusione naturale che a seguito di trasporto con automezzi utilizzati accidentalmente dall'insetto.** I rischi che Xfp possa diffondersi in altre regioni limitrofe determinando un aggravamento dei già notevoli danni causati all'industria olearia del Mezzogiorno sono elevati e non mancano segnalazioni di focolai.



**Le misure per contenere l'ulteriore diffusione e il controllo del patogeno, oltre al contenimento delle popolazioni del vettore, la realizzazione di impegnative campagne di monitoraggio in tutte le aree olivicole del Paese, anche con la messa a punto di sempre più avanzati metodi di monitoraggio e l'individuazione e l'utilizzo di cultivar tolleranti in parte già disponibili, si ritiene possano essere affiancate dall'applicazione di strategia TEA per la tutela delle cultivar di olivo tipiche italiane.**



## Melo e Pero

La **ticchiolatura**, causata da *Venturia inaequalis* Cooke (Wint.) e *Venturia pirina* (Aderh.), è **una delle malattie più devastanti delle due specie. Il fungo infetta foglie, frutti, rami, piccioli e steli, ma foglie e frutti sono le parti più colpite della pianta. In casi gravi di infezione, sono state segnalate perdite di produzione superiori al 70%**. Le regioni temperate con climi umidi sono altamente suscettibili a questa malattia. Diversi tipi di **fungicidi vengono utilizzati fino a 30 volte nell'arco di un anno** per controllare la malattia. Ciò solleva preoccupazioni per l'ambiente e la salute umana e aumenta anche i costi di produzione complessivi. Inoltre, l'uso estensivo di fungicidi ha portato **all'evoluzione di resistenze multifungicida** nelle popolazioni del fungo. Cultivar di mele resistenti alla ticchiolatura sono state introdotte come approccio alternativo al controllo delle malattie, tuttavia, la malattia è riemersa in aree in cui sono state coltivate cultivar resistenti a causa della rottura della resistenza da parte del patogeno. Per questa malattia grazie **all'uso delle TEA sono state già ottenute linee resistenti di melo mediante cisgenesi**.

## Pesco

La **più grave malattia virale** che colpisce le drupacee è la **"sharka"** il cui agente eziologico è il plum pox virus (PPV). La malattia è presente in Italia e in numerosi areali di produzione a livello mondiale. **Il virus è trasmesso in maniera non persistente da varie specie di afidi ed il trattamento con insetticidi non riesce a contenere la malattia. Il virus è diffuso anche con materiale di propagazione vegetativa ed è stata questa la via di diffusione a livello mondiale.**

Mediante il miglioramento genetico classico non è stato possibile ottenere varietà resistenti con buone caratteristiche agronomiche, per cui **l'applicazione delle TEA** – ed in particolare la mutagenesi mirata mediante genome editing del gene di suscettibilità dell'ospite *eIF(iso)4E* – risulta attualmente **la strada più promettente per la lotta alla patologia**, unitamente allo sviluppo di metodi sempre più mirati di controllo delle popolazioni di Afidi.



## Agrumi

**Il Mal secco** degli agrumi è una fitopatologia causata dal **fungo** *Plenodomus tracheiphilus* (ex *Deuterophoma tracheiphila*), che può attaccare quasi tutte le specie di *Citrus* e in particolare limone (*Citrus limon*), cedro (*Citrus medica*) e bergamotto (*Citrus bergamia*). Attraverso fusti e radici, il patogeno è noto per infiltrarsi nel sistema di conduzione della pianta, causando la tipica sindrome da tracheomicosi, **impedendo il trasporto di acqua e sostanze minerali**, indispensabili per la sopravvivenza del vegetale, decretandone un drammatico declino.

La **Sicilia è una delle Regioni europee più colpite** e – sui suoi territori – la lotta è obbligatoria, per mezzo di potature ed estirpazioni degli alberi infetti, con successiva bruciatura sul posto. La prevenzione è, ad oggi, una via prioritaria di contrasto allo sviluppo di epidemie di Mal secco degli agrumi, per questo, l'applicazione delle TEA rappresenta la via più incoraggiante per debellare questa malattia.

## Frumento

Il frumento (tenero e duro) è particolarmente interessato **da tre patologie fungine**: la septoriosi, causata da *Zymoseptoria tritici*, il complesso delle ruggini (Ruggine bruna – *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, Ruggine gialla – *Puccinia striiformis* e Ruggine nera – *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*), e la fusariosi della spiga (*Fusarium Head Blight*), alla quale sono associate diverse specie di *Fusarium*, tra le quali predominano *F. graminearum* con diversi chemiotipi, *F. culmorum*, *F. avenaceum*)



e *Microdochium nivale*, specie che determinano sia un danno diretto, legato a minore produzione di granella, sia uno indiretto, dovuto alla produzione di micotossine, prime tra tutte il deossinivalenolo (DON), oltre che alle enniatine e zeralenone.

Negli ultimi anni, si è assistito all'aumento di incidenza di altre specie (*F. poae* e *F. langsethiae*), la cui importanza è legata alla produzione di altre classi di micotossine (nivalenolo, T2/HT2), altrettanto pericolose per la salute umana e del bestiame. **La diffusione e l'incidenza delle diverse specie è legata a fattori climatici (pioggia e temperatura in primis), ma anche agronomici e genetici, che modulano la gravità delle epidemie in campo.** In linea generale, primaverae calde e piovose favoriscono la septoriosi, mentre per la ruggine bruna, la più diffusa delle tre è favorita da periodi freschi in alternanza periodi più caldi e asciutti. La fusariosi della spiga è invece favorita da periodi umidi e piovosi durante la fioritura, soprattutto per il frumento duro per il quale non sono disponibili varietà resistenti o tolleranti. La possibilità di ottenere **varietà di frumento duro resistenti al complesso della fusariosi della spiga è di estremo interesse, in quanto consentirebbe la coltivazione in areali a rischio di infezione, senza il ricorso a trattamenti antiparassitari costosi e nocivi per l'ambiente.** Per questo motivo, l'utilizzo delle TEA pare, anche in tal caso, lo strumento più efficace per il contrasto a queste patologie/ o allo sviluppo di linee a ridotto tenore di micotossine.

## Riso

**Il brusone del riso, causato da *Pyricularia oryzae*, è la principale malattia fungina del riso in tutte le aree dove esso viene coltivato. Le perdite produttive sono molto elevate, soprattutto nelle varietà appartenenti alla tipologia "lungo**

**A"** che annovera la maggior parte di quelle utilizzate per i risotti (Carnaroli, Arborio, Baldo, ecc.) e che costituiscono autentiche eccellenze del panorama risicolo nazionale. Molto suscettibili a questo patogeno sono anche il Vialone Nano ed altre varietà di più recente introduzione. **La sua presenza è stata segnalata in 85 Paesi ed è causa di perdite produttive che possono arrivare sino al 50%.** La malattia è stata favorita in Italia negli ultimi anni



da alte temperature unite a periodi con elevata umidità alternati a periodi di siccità nel periodo estivo. **L'applicazione delle TEA ha già permesso l'ottenimento di una varietà di riso con aumentata resistenza al brusone.**

Accanto al brusone, sta assumendo una rilevanza notevole la **diffusione del bakanae**, causata da *Fusarium fujikuroi*, patogeno trasmissibile attraverso il seme, anche a causa della mancanza di varietà resistenti e dal sempre minor numero di principi attivi autorizzati per la concia chimica. La conoscenza della struttura genetica di popolazioni italiane e straniere del fungo, consolidata presso il CREA-Difesa e Certificazione di Roma, fornisce un valido supporto ai programmi di miglioramento genetico per la resistenza alla malattia.

## Pomodoro

**Tra le malattie virali, il tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) costituisce sicuramente, al momento, la maggiore minaccia.**

Si tratta di un virus in rapida diffusione in tutto il mondo, con forte impatto sulla produzione e distribuzione del pomodoro, in particolare da mensa. Il ToBRFV appartiene al genere Tobamovirus ed è strettamente correlato al tabacco mosaic virus (TMV) e al tomato mosaic virus (ToMV) ed è in grado di superare le resistenze ai Tobamovirus già presenti nella stragrande maggioranza di varietà di pomodoro (geni Tm2<sup>2</sup>, Tm1). Ciò significa che **tutte le varietà di pomodoro che risalgono a prima del 2022 sono suscettibili al ToBRFV**. Il ToBRFV è **trasmesso meccanicamente**, ciò significa che qualsiasi contatto con il virus può diffondere la malattia. Attività quali il trapianto, la potatura, la legatura, la coltivazione, i trattamenti spray e la raccolta sono mezzi di trasmissione del virus. Anche materiali come vestiti, scarpe, attrezzature e strumenti possono trasportare e diffondere il virus; la trasmissione può anche avvenire tramite insetti, come i bombi. Inoltre, proprio come gli altri Tobamovirus, il ToBRFV è **molto duraturo e contagioso**. Può sopravvivere a lungo in acqua, sulle superfici e in assenza di materiale vegetale, senza perdere la sua virulenza. Tutte queste caratteristiche rendono la lotta al virus ed alla malattia molto difficoltosa. Di conseguenza **l'unica efficace possibilità di controllo è quella di individuare nuove varietà che presentino caratteristiche di resistenza/tolleranza al ToBRFV**.



Un'altra **fitopatia molto importante del pomodoro è il "tomato yellow leaf curl disease" (TYLCVD) causata da virus con genoma a DNA appartenenti al genere Begomovirus, trasmessi da pianta a pianta dal vettore Bemisia tabaci, Aleiurodide o "mosca bianca", insetto altamente polifago in grado di infestare oltre 500 specie vegetali**. I metodi di controllo per prevenire la trasmissione del virus da parte della *B. tabaci* si basano sia sull'uso ripetuto di trattamenti con insetticidi che sull'utilizzo di reti a maglia fine. I tentativi di contenere l'infezione, controllando la diffusione dell'insetto vettore mediante insetticidi, sono economicamente svantaggiosi e rappresentano un reale pericolo per l'ambiente, la salute dei coltivatori e dei consumatori. Inoltre, **l'utilizzo intensivo di fitofarmaci ha già determinato la selezione di popolazioni di *B. tabaci* resistenti**.

Negli ultimi 25 anni, i programmi di miglioramento genetico si sono concentrati sul trasferimento di geni di resistenza/tolleranza al TYLCV dalle specie selvatiche alla specie coltivata. A partire dal 2016 in Sicilia, nelle zone vocate per la produzione di pomodoro da serra, e successivamente nel bacino del Mediterraneo, si sono registrate importanti infezioni dovute alla comparsa di isolati ricombinanti tra due begomovirus, il tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) e il tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). Gli isolati virali ricombinati sono in grado di superare le tolleranze/resistenze introdotte. **È quindi importante identificare ed introdurre geni di resistenza a questa nuova classe di patogeni. L'utilizzo di TEA potrebbe essere un utile strumento per agire sui geni di suscettibilità della pianta invece che su quelli di -resistenza che sono più facilmente superabili da parte degli organismi nocivi.**



Per quanto concerne i **funghi**, le malattie più comuni (tracheomicosi causata da *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e la tracheovorticilliosi causata da *Verticillium dahliae*) sono state oggetto di numerosi studi in tutto il mondo, portando alla **creazione di linee di pomodoro dotate di resistenze efficaci anche nei confronti di diverse razze conosciute**. Viceversa, altre patologie meno note – in quanto la loro diffusione ed incidenza è stata tenuta sotto controllo da trattamenti chimici al terreno, con l'inesorabile diminuzione del numero dei principi attivi e del numero di trattamenti consentiti – stanno tornando alla ribalta. Tra queste, la suberosi radicale causata da *Pyrenochaeta lycopersici* che attacca le radici del pomodoro sia in serra che in pieno campo e che ne riduce le capacità produttive. Il CREA-DC svolge da anni ricerche volte alla caratterizzazione del patogeno, allo studio dell'epidemiologia e del rapporto che instaura con l'ospite, ricerche particolarmente importanti nel ricorso alle TEA per il controllo di questa malattia.



Altra malattia importante per questa coltura è la Peronospora, causata dall'oomicete (ndr. fungo acquatico) *Phytophthora infestans*, una malattia distruttiva, soprattutto per il pomodoro in serra, in quanto può attaccare diversi organi della pianta (foglie, fusti e frutti). Come tutti gli oomiceti, la diffusione della malattia è molto rapida ed è agevolata da condizioni di umidità e vento, che favoriscono la dispersione dei propaguli infettivi. Il patogeno, inoltre, è in grado di produrre strutture di conservazione durevoli, che gli consentono di sopravvivere da un'annata all'altra sui residui colturali infetti del pomodoro o di altre solanacee spontanee. **Diversi studi hanno mostrato il coinvolgimento di alcuni lncRNAs (long coding RNAs) e miRNA (micro RNAs) nella risposta del pomodoro ad infezione di *P. infestans*; l'editing di questi lncRNA/miRNA con la tecnologia TEA basata su CRISPR/Cas9 sembra essere una strategia promettente per la generazione di piante di pomodoro resistenti a *P. infestans*.**

**Warning! Patogeni delle piante non ancora presenti nel territorio nazionale, ma ad elevato rischio di introduzione nel breve periodo (per i quali sarebbe importante avviare a scopo preventivo studi approfonditi al fine di realizzare per tempo piante resistenti).**

## Agrumi

*Guignardia citricarpa* Kiely (*Phyllosticta citricarpa*) è l'agente causale del punto nero o **macchia nera (citrus black spot)**, la **malattia fungina più importante degli agrumi**. È una malattia **endemica in alcuni stati: Sud America, Asia, Sud Africa e Australia e, recentemente, è stata segnalata in Tunisia**. Di conseguenza i frutti provenienti da zone infette **rappresentano un rischio per l'introduzione di questo patogeno nei nostri territori**.

*Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc). Questo patogeno, agente eziologico del **cancro batterico degli agrumi, non è presente sul territorio europeo. La malattia, estremamente distruttiva e contagiosa**, colpisce gli agrumi. I sintomi di infezione grave includono perdita di foglie, caduta prematura dei frutti, deperimento, grave imperfezione o scolorimento dei frutti e diminuzione della qualità dei frutti. Le misure di controllo disponibili contro questo patogeno si basano sull'uso di prodotti chimici a base di rame, unitamente all'eliminazione delle piante infette. **Nei paesi in cui il patogeno è presente varie ricerche sono in corso per definire metodi di controllo della malattia, inclusa l'applicazione di agenti di biocontrollo. Il ricorso alle TEA per le varietà italiane di agrumi potrebbe essere una strategia percorribile per fronteggiare questo patogeno, nell'eventualità di una introduzione accidentale.**

Le specie di '*Candidatus Liberibacter*' agenti causali del **citrus greening** (anche noto come huanglongbing, HLB). Questa malattia è considerata **a livello mondiale una delle più impattanti per l'agrumicoltura. Segnalata per la prima volta in Cina nel XIX secolo è ora riportata in più di 50 paesi tra Asia, Africa, Oceania e Americhe; non è presente in**

**Europa anche se un suo insetto vettore è stato segnalato nella penisola iberica.** Praticamente tutte le specie e le cultivar di agrumi commerciali sono suscettibili, indipendentemente dai portainnesti. Purtroppo, al momento, anche con le biotecnologie si stanno avendo difficoltà nell'ottenimento di resistenza; per questo, ai fini della individuazione di una efficace strategia di controllo, si confida in particolare su ricerche avanzate, mirate a interferire sui meccanismi e sulle sostanze implicate nell'interazione ospite-patogeno.

## Grano duro e tenero

Nel grano duro e tenero il **principale patogeno batterico** è lo *Xanthomonas translucens*, che causa la **striatura batterica delle foglie (BLS) attualmente assente in Europa**. La malattia BLS del grano è stata riscontrata in quasi tutte le aree di coltivazione a livello mondiale e **può causare fino al 40% di perdite del raccolto**. Negli areali in cui il patogeno è presente, la maggior parte delle cultivar di grano sia tenero che duro risulta suscettibile e non sono disponibili metodi chimici per il controllo della BLS in campo.

Alcune tecniche di gestione integrata dei parassiti (IPM) possono essere utilizzate per aiutare a prevenire l'infezione, sebbene nessuna prevenga completamente la malattia. Ad oggi, l'unico metodo per prevenire questo patogeno è l'utilizzo di semente sana. È da segnalare l'attuale limitata conoscenza dei meccanismi di interazioni ospite-patogeno: per questo approfondire tali conoscenze è di cruciale importanza nella individuazione di nuove strategie di difesa al BLS.

## Riso

Nel riso i principali patogeni batterici da segnalare sono *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* che causano **rispettivamente la malattia batterica delle foglie del riso (BLB) e la batteriosi traslucida delle foglie del riso. Questi patogeni non sono presenti in Europa**. BLB è presente in Asia, in America Latina, Australia e nei paesi caraibici. **Nel mondo è stato riportato che le perdite di resa dovute a BLB variano dal 2% al 74%, a seconda delle caratteristiche pedoclimatiche della zona di coltivazione del riso, dello stadio di crescita della pianta e della cultivar coltivata**. I metodi per controllare la BLB hanno un'efficacia limitata. Il controllo chimico è stato in gran parte inefficace per ridurre i danni causati dalla malattia. I metodi di controllo biologico, basati sull'uso di antagonisti batterici possono ridurre i danni della BLB, ma non sono risolutivi. L'applicazione delle TEA per l'ottenimento di varietà italiane di riso resistenti, si ritiene possa essere una strategia perseguibile per essere pronti a salvaguardare le varietà di riso italiane, nell'eventualità che questi patogeni entrino in Europa.

## Pomodoro

Il patogeno batterico più importante per la coltura del pomodoro è *Ralstonia solanacearum* (**Rs**) **non presente attualmente in Italia**. Ad oggi, il metodo principale per contrastare la diffusione di questo patogeno è l'utilizzo di semente sana. Rs è uno dei più importanti agenti causali delle malattie da avvizzimento batterico nelle solanacee. **I danni causati da Rs nel pomodoro possono equivalere a una perdita di resa del 35%–90%, in condizioni di alte temperature e alta umidità, nelle regioni tropicali, subtropicali e temperate del mondo**. La gestione della malattia utilizzando i prodotti agrochimici disponibili è difficile e finora nessuna singola strategia di controllo ha



mostrato un'efficienza del 100%. Di conseguenza, nei paesi in cui Rs è presente, la gestione della malattia avviene con un approccio integrato. Unitamente al mantenimento del massimo livello di attenzione con riguardo all'utilizzo di sementi sane certificate, anche per questa avversità rivestono un'importanza primaria gli studi sull'applicazione delle TEA al fine di tutelare le varietà di pomodoro italiano.

## Il CREA-Difesa e Certificazione e l'ottenimento di resistenza a patogeni mediante biotecnologie

Nel 1993 la sede di Roma del CREA DC (allora Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale) è stata la prima Istituzione pubblica italiana ad effettuare, a scopo sperimentale, prove controllate in campo con piante ottenute con biotecnologie avanzate, mediante presentazione di notifica al ministero della Salute, secondo la Direttiva del Consiglio CEE 90/220. Le ricerche avanzate interessarono **varietà di pomodoro resistenti al virus del mosaico del cetriolo (CMV), patogeno** che in quegli anni aveva colpito gravemente il pomodoro coltivato in pieno campo.



Di fondamentale importanza per l'ottenimento di resistenza ad ampio spettro fu lo studio epidemiologico preliminare, dal quale emerse che gli isolati virali responsabili della malattia sul territorio nazionale appartenevano a due ceppi distinti del CMV. **La strategia, basata sull'espressione in pianta del gene per la proteina del capsido virale, fu, pertanto, adattata per rispondere adeguatamente alla situazione epidemiologica italiana.**

Dal 2000 il CREA-DC, coinvolto, in qualità di responsabile in progetti finanziati dal MASAF e dal CREA, nell'ottenimento di resistenza – mediata dall'attivazione del meccanismo di RNA interference (RNAi)- al plum pox virus (PPV), agente eziologico della **"sharka"** che, come anticipato, è la più devastante malattia virale che colpisce le drupacee. Sulla base di evidenze epidemiologiche e molecolari furono disegnati quattro vettori di silenziamento del genoma di PPV valutati inizialmente in pianta modello. Le piante generate risultarono immuni/altamente resistenti non solo ai ceppi di PPV più importanti da un punto di vista economico e provenienti da diverse regioni geografiche, ma anche a quelli più lontani da un punto di vista filogenetico. Inoltre, il carattere di resistenza introdotto si dimostrò stabile anche in condizioni di stress note per inibire il meccanismo dell'RNAi. Il migliore tra i vettori molecolari prodotti fu successivamente inserito in susino. **Le piante ottenute sono risultate resistenti a PPV sia in vitro sia in serra.** Inoltre, in un recente lavoro è stato dimostrato che, utilizzando come porta-innesto il susino resistente al PPV, è possibile trasmettere il carattere di resistenza all'albicocco wild-type utilizzato come innesto.

Le tecnologie applicate in passato in tale ambito prevedevano l'inserimento e l'espressione in pianta di porzioni di DNA esogeno, non derivante dal "pool genico" della pianta stessa, mentre oggi, con l'avvento delle TEA, è possibile intervenire in maniera meno invasiva nel genoma di interesse. Al riguardo, data l'importanza della "sharka" delle drupacee, BIOTECH (il più importante progetto pubblico sul miglioramento genetico in agricoltura degli ultimi anni coordinato dal CREA) ha previsto tra i suoi obiettivi di ricerca **l'ottenimento della resistenza a PPV in pesco mediante genome editing** e il CREA DC ha partecipato per la verifica della resistenza. Sempre nell'ambito di BIOTECH sono state avviate ricerche sulla risposta a patogeni fungini di linee di pomodoro resistenti ad Orobanche, ottenute da CREA-Orticoltura e Florovivaismo, e sull'applicazione delle TEA per modificare uno o più geni di suscettibilità di pomodoro al fungo *P. lycopersici* per limitarne la capacità di indurre la malattia.



Il Centro CREA DC è altresì impegnato ad analizzare **linee di melo cisgeniche**, ottenute dall'Università di Bologna e dalla Fondazione Edmund Mach, per l'interazione con *Venturia inaequalis* e a delucidare, in collaborazione con il CREA-Genomica e Bioinformatica di Montanaso, l'interazione tra *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* (FOMG) e **melanzana** per agevolare la ricerca di geni di resistenza. A tal fine al CREA DC sono stati identificati, mediante sequenziamento del genoma fungino ed associata analisi dell'espressione genica durante l'interazione, otto geni candidati – portatori di virulenza/patogenicità. È stato quindi messo a punto un sistema CRISPR/Cas9 per il knockout dei geni candidati per dimostrarne il coinvolgimento nella malattia. Infine, il Centro collabora con l'ENEA per l'ottenimento di piante di **patata** editate per la resistenza ad uno dei più importanti virus che colpiscono questa coltura, il Potato virus Y (PVY).

## **Impatti ambientali & Biotecnologie: gli studi del CREA Difesa e Certificazione**

Il CREA-DC è stato pioniere in Italia in tale settore, anche svolgendo prove di biosicurezza sia in relazione alla presenza del gene esogeno nei pomodori trasformati industrialmente, sia con riferimento all'eventuale dispersione di polline alle piante di controllo. In questo ambito, ha svolto indagini anche relativamente all'impatto ecologico su ecosistemi forestali adiacenti ai campi sperimentali, con una impegnativa attività sviluppata nel quadro del Life Forest- Forest Focus, quale responsabile del progetto "Gmo&Biodiv".

hanno contribuito: Maria Aragona, Francesco Faggioli, Anita Rose Haegi, Alessandro Infantino e Valeria Scala

# Agricoltura & Ambiente: l'impatto.

## Intervista a Giuseppe Corti, Direttore CREA Agricoltura e Ambiente

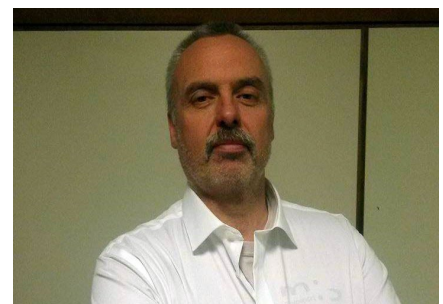
Di Micaela Conterio



Tema di grande attualità al centro del dibattito scientifico e politico, ma su cui esiste ancora molta incertezza, preoccupazione e disinformazione: le TEA, Tecniche di Evoluzione Assistita che giocano un ruolo strategico per rafforzare e innovare il Made in Italy, rendendo i nostri prodotti migliori, resistenti a stress biotici e abiotici, sempre più competitivi e sostenibili, ma al contempo di qualità e soprattutto autenticamente italiani.

Tema di grande attualità al centro del dibattito scientifico e politico, ma su cui esiste ancora molta incertezza, preoccupazione e disinformazione: le TEA, Tecniche di Evoluzione Assistita che giocano un ruolo strategico per rafforzare e innovare il Made in Italy, rendendo i nostri prodotti migliori, resistenti a stress biotici e abiotici, sempre più competitivi e sostenibili, ma al contempo di qualità e soprattutto autenticamente italiani.

**Giuseppe Corti**, Direttore Centro Agricoltura e Ambiente



Sono pericolose per la salute e per l'ambiente? Quanto impattano sulle risorse naturali? Ne parliamo con Giuseppe Corti, Direttore del CREA Agricoltura e ambiente.

## 1) In generale, come impattano le TEA sulle risorse naturali?

L'impatto della TEA che possiamo prevedere è indubbiamente positivo, perché se riusciamo a produrre delle colture in grado di resistere, anche se non completamente, a patogeni o insetti, siamo in grado di coltivarle con un minor impiego di prodotti e sostanze per la loro difesa, con un vantaggio economico per gli agricoltori, ma anche e soprattutto per l'ambiente. **Bisogna sfatare il falso mito che piante o colture ottenute con le TEA possano essere dannose o pericolose per l'ambiente: al momento, infatti, non esistono evidenze scientifiche in tale senso.** Non si tratta più di quelle tecniche, impiegate fino ad una decina di anni fa o più, che prelevavano parti del DNA di una specie per inserirli in un'altra; oggi, le tecnologie utilizzate consentono di inserire all'interno del genoma di una pianta alcuni geni, utili e funzionali ad un determinato scopo, che appartengono però alla stessa specie o alla stessa famiglia di piante e non di provenienza esterna. Proprio per questo **si chiamano TEA, Tecniche di Evoluzione Assistita: perché implicano inserimenti e innesti di geni, che potrebbero avvenire in maniera naturale e spontanea, ma vengono accelerati e favoriti con le TEA.** Fugati i dubbi sulla pericolosità per l'ambiente, per flora o fauna, le TEA hanno ricadute positive anche sulla salute umana, perché nonostante l'Italia sia fra i paesi con le maggiori garanzie di salubrità e fra quelli che maggiormente controlla i prodotti alimentari al mondo, **con queste nuove tecniche avremo un'ulteriore riduzione della presenza di sostanze nocive all'interno delle derrate alimentari.**

## 2) in particolare: su suolo?

Certo che avranno ricadute positive anche sul suolo. Se parliamo di suolo, la prima immagine che ci viene in mente è la parte minerale del terreno, quando in realtà il suolo è molto di più. È formato, infatti, da tantissimi microrganismi viventi: basti pensare che in un cucchiaino da tè di terra, prelevata dai primi 5 centimetri di suolo, vivono da 100 milioni a 10 miliardi di cellule di microrganismi, appartenenti a centinaia di migliaia di specie diverse. Si tratta di una ricchezza incredibile non solo in termini di biodiversità, ma anche di funzionalità ecologica: in quel suolo così ricco di microrganismi, infatti, è possibile che venga degradata qualunque molecola organica venga introdotta e la loro presenza è, innegabilmente, una garanzia eccezionale dal punto di vista ambientale. I microrganismi purtroppo non possono depurare il suolo dai metalli pesanti, che non possono essere chimicamente degradati, ma possono essere immobilizzati – resi cioè meno disponibili per le piante – e su questo anche i microrganismi intervengono. Questo si traduce in salute per i nostri suoli e per i prodotti alimentari, perché unendo l'attività di questa biodiversità microbica a quella della varietà biologica in termini di pedofauna (gli animalletti delle dimensioni inferiori ai 3-4 millimetri, quali ragni, zecche, larve, acari, ecc.) aumentano la fertilità e la qualità dei suoli, in quanto sostanze inquinanti e nocive vengono eliminate o immobilizzate.

**Perché quindi le TEA sono positive sui suoli? Perché se avremo una minore introduzione di prodotti necessari alla difesa delle piante, avremo, di conseguenza, una minore aggressione al comparto vivente del suolo (pedofauna e microrganismi), a nostro vantaggio e beneficio.**



### 3) In particolare: su acqua?

Anche sull'acqua hanno ovviamente effetti benefici. Si parla tanto del glifosate, che ha un livello di tossicità bassissimo, quasi inesistente. Tutto in natura può essere tossico, dipende dalle quantità; è noto infatti che: si può morire anche di troppa acqua: ad una persona di normale statura e peso, bere 7 litri di acqua in un giorno può essere fatale. Questo per dire che l'uso del glifosate in agricoltura non produce più danno di tante altre sostanze comunemente utilizzate, e questo non produce alcun danno se viene usato correttamente, cioè come dissecante per le piante spontanee che entrano in competizione con le colture, cioè le malerbe. Il glifosate a volte trovato nelle acque superficiali o di falda non dipende dall'uso corretto che se ne fa in agricoltura, ma da uno scorretto, quando viene usato, per esempio, per diserbare i fossi, i cigli delle strade o delle ferrovie; in questi casi una pioggia può solubilizzare rilevanti quantità di glifosate, facendole confluire rapidamente in torrenti, fiumi o falde. Questo succede perché l'acqua di pioggia ha trovato il glifosate immediatamente accessibile, cosa che non sarebbe accaduta o sarebbe accaduta con probabilità molto inferiore, se fosse stato usato correttamente per diserbare le malerbe. **Se le TEA, quindi, forniranno piante in grado di resistere a determinate molecole con uso specifico contro le malerbe che infestano i campi coltivati, ne avremo un vantaggio, purché si faccia un uso accorto e corretto in agricoltura di queste molecole;** diversamente, nel caso di un uso scorretto, non possono essere ritenuti responsabili per i danni causati all'ambiente né il glifosate né le TEA.

### 4) In particolare: sulle pratiche agronomiche?

Con le TEA le cose cambieranno sicuramente anche dal punto di vista agronomico. Basti pensare che due dei problemi che affliggono il suolo sono la sigillazione e il compattamento. La prima rappresenta la copertura del suolo da parte di cemento e asfalto che ne determinano l'impermeabilizzazione, la seconda è dovuta all'eccesso di traffico delle macchine operatrici in campo, necessario per diverse pratiche agronomiche, inclusa la distribuzione di prodotti fitosanitari. **Se le TEA ci forniranno colture in grado di difendersi da patogeni e insetti, ci sarà una minor esigenza di effettuare trattamenti e, di conseguenza, avremo una minor trafficabilità sui suoli, un minor compattamento del terreno, una minore necessità di dotarsi di macchinari e, quindi, un maggior risparmio economico per gli agricoltori. Non solo. Cambieranno anche certe pratiche agronomiche, sempre a vantaggio nostro, in quanto sarà possibile avere maggiori densità di semina o di impianto (per le colture arboree).** Incrementando la densità, aumenterà di conseguenza anche la produzione, rispondendo così alla crescente domanda di fabbisogno nutritivo della popolazione mondiale. Le TEA, quindi, racchiudono le potenzialità non solo di far fronte a problemi di carattere ambientale, ma anche di natura etica.

### 5) Costi/benefici?

**I costi sono rappresentati da quelli sostenuti per la ricerca, anche se, in realtà, si tratta di investimenti,** che fanno risparmiare su altri fronti: a volte in vite umane, altre in denaro, con un semplice vantaggio economico, che, per le piccole aziende agricole italiane, a conduzione familiare, in molti casi coincide con la loro stessa sopravvivenza.

Altri costi saranno dati dal **prezzo di alcune sementi, che costeranno di più** in virtù del fatto che saranno state rese resistenti a patogeni o a sbalzi climatici tramite le TEA. Tali costi, però – e questi sono i benefici – saranno **ampiamente ripagati dal risparmio economico e ambientale, derivato dalla minore necessità di input esterni.**

## TEA in frutticoltura: istruzioni per l'uso

Di Ciacciulli / Licciardello



Negli ultimi anni, il nostro Paese ha investito molto, attraverso finanziamenti nazionali e internazionali, per applicare le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) in frutticoltura. Il progetto BIOTECH ha rappresentato l'opportunità per andare oltre rispetto a quanto fatto dai colleghi internazionali. Scopriamo insieme come potrebbe cambiare la frutta con le TEA

I cambiamenti climatici stanno impattando profondamente sulle produzioni agroalimentari, abbassandone la qualità e la resa. In questo contesto, negli ultimi anni, la comunità scientifica internazionale ha dedicato molte energie per migliorare la resilienza e la sostenibilità in agricoltura. L'Italia, che è tra i principali produttori europei di diverse specie da frutto, ha avviato numerose iniziative progettuali per tutelare e valorizzare le peculiarità del "Made in Italy", sfruttando le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA). Nonostante la loro importanza, le colture frutticole risentono delle difficoltà associate agli approcci di miglioramento genetico classico, soprattutto in termini di impegno finanziario, disponibilità di risorse del suolo e lunghi tempi di attesa necessari per la crescita e la valutazione delle piante. Le TEA, invece, superano alcuni dei limiti del miglioramento genetico tradizionale, intervenendo con precisione sul gene e sul carattere da migliorare.

## Le TEA sulle specie da frutto nel mondo

Lo scorso 4 Gennaio 2023, sulla rivista *International Journal of Molecular Sciences*, è stata pubblicata la review dal titolo "[\*The Role of Italy in the Use of Advanced Plant Genomic Techniques on Fruit Trees: State of the Art and Future Perspectives\*](#)" a cura di un gruppo di ricercatori dei Centri CREA Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura/ Viticoltura ed Enologia/ Genomica e Bioinformatica.

L'obiettivo dell'articolo è stato quello di illustrare alla comunità scientifica internazionale il ruolo della ricerca italiana sull'utilizzo delle Tecnologie di Evoluzione Assistita in frutticoltura, con **un focus specifico su agrumi, vite, melo, pero, castagno, fragola, pesco, e kiwi. A fronte di quanto già sviluppato dagli altri Paesi, per ogni coltura vengono presentati i geni e i tratti principali su cui stanno lavorando gli scienziati del nostro Paese, nonché i miglioramenti tecnologici e gli avanzamenti sulla rigenerazione delle varietà locali. Infine, un focus è stato rivolto agli aspetti giuridici nel contesto europeo, con particolare riferimento a quello italiano.**

La stesura della rassegna è stata possibile grazie ai risultati ottenuti nell'ambito del finanziamento BIOTECH (Mipaaf oggi MASAF, 2018-2021)- e in particolare ai progetti CITRUS, VITECH, BIOSOSFRU – attraverso cui sono state acquisite le competenze su *genome editing* e cisgenesi, intervenendo sulla rigenerazione delle varietà locali da migliorare.

Il CREA ha collaborato anche con altre Istituzioni italiane (Università di Bologna, Catania, Verona, Politecnica delle Marche, CNR di Torino e Fondazione Edmund Mach di S. Michele all'Adige) che, in alcuni casi, con fondi propri (extra BIOTECH), hanno contribuito ad ampliare lo scenario che vede le TEA protagoniste del miglioramento della qualità di fruttiferi, come ad esempio il castagno (Università di Torino).

A livello internazionale, dal 2012 – quando uscì la prima pubblicazione in campo agrario – ad oggi, le TEA sono state oggetto di articoli scientifici, soprattutto da parte di gruppi americani e cinesi, indirizzate alla difesa delle piante da frutto contro gli stress biotici e abiotici. In agrumi, ad esempio, si è lavorato quasi esclusivamente per disattivare i geni della suscettibilità al batterio che causa il cancro degli agrumi; in vite invece l'attenzione è stata rivolta su diverse patologie quali la botrite e la peronospora. Diversamente, in specie come kiwi e pero, la ricerca è stata indirizzata all'anticipazione della fioritura.

## L'Italia ha sfruttato i limiti delle TEA come sfide vincenti

Nonostante le loro potenzialità, le TEA risentono di limiti tanto vincolanti da scoraggiarne l'uso. Alcuni sono di carattere generale e valgono con riferimento sia alle specie da frutto che ad altre colture. Il progetto BIOTECH ha rappresentato per l'Italia l'opportunità di andare oltre rispetto a quanto fatto dai colleghi internazionali.

### 1. La disponibilità del gene è il primo requisito essenziale

La conoscenza dei geni responsabili di caratteri di interesse non sempre è disponibile; in questi casi disporre del genoma (ovvero di tutto il corredo genetico di un organismo) rappresenta un valido punto di partenza ed è, in ogni caso, un elemento essenziale per l'applicazione delle TEA.

L'Italia ha sfruttato le TEA per migliorare la qualità dei frutti. In **agrumi**, il CREA-Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura (CREA – OFA) di Acireale ha concentrato i propri sforzi per **(A) coniugare antocianine e licopene in un unico frutto**, sia sfruttando la cisgenesi (inserendo il gene *Ruby* – responsabile della presenza della colorazione rossa a carico delle antocianine – negli agrumi con licopene, come ad esempio il pompelmo rosa), sia il *genome editing* (nella fattispecie, il gene della *b-ciclasa* – che converte il licopene in *b*-carotene – nelle varietà di arancio con antocianine), e **(B) per produrre frutti senza semi** (apireni), editando (ovvero disattivando) il gene *IKU1* che blocca lo sviluppo del seme. Tentare di soddisfare la richiesta di frutti apireni è stato l'obiettivo del lavoro svolto anche dal CREA-Viticoltura ed Enologia di Turi che, per produrre **uva da**



**tavola apirena** delle varietà Italia e Victoria, ha editato il gene *VvAGL11*. Presso la propria sede di Conegliano, lo stesso Centro di ricerca ha editato il gene MLO6/7 per far fronte alla **suscettibilità all'oidio** e il gene EPFL9 per migliorare la **tolleranza allo stress idrico**. In **kiwi** il CREA-Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura di Roma, insieme al Centro di Genomica e Bioinformatica di Fiorenzuola, ha sfruttato il *genome editing* per disattivare il gene di suscettibilità AP2/ERF al **cancro batterico**.

## 2. La rigenerazione di una pianta migliorata è varietà-dipendente

L'attitudine alla trasformazione e alla rigenerazione è una peculiarità delle singole varietà e poco importa se si parla di specie ortive (pomodori, peperoni, melanzane), erbacee (orzo, frumento, riso, soia), o da frutto. **Qualsiasi tessuto o cellula si stia trasformando, questa dovrà essere in grado di generare una intera piantina editata/cisgenica. Tale processo prende il nome di "rigenerazione"**. L'utilizzo delle TEA ha senso solo se si è in grado di migliorare "la" varietà di interesse che, pertanto, deve essere docile alla trasformazione e alla rigenerazione.

I tessuti maggiormente pronti alla rigenerazione degli agrumi sono piccole porzioni di fusto di plantule allevate *in vitro* (internodi) – ma anche foglie e semi, sebbene l'efficienza differisca molto.

È stato inoltre dimostrato che le singole varietà hanno un proprio tessuto che si adatta meglio alla trasformazione, sebbene l'ideale sarebbe partire dai **protoplasti** (cellule private della loro parete cellulare che sono in grado di rigenerare una pianta intera).



1. A sinistra: interno di arancio doppio sanguigno con germogli. A destra: cotiledoni arancio Bud blood con germogli

In ogni caso **molte varietà di arancio dolce con antocianine e pompelmo con licopene sono state per la prima volta trasformate e rigenerate grazie al CREA**. Nella vite l'unico tessuto da utilizzare, e da cui è possibile isolare i protoplasti, è il callo embriogenico (ovvero, agglomerato di cellule indifferenziate) ottenuto da tessuti del fiore come antere e ovari; ma anche la produzione di callo è strettamente genotipo-dipendente e molte varietà di vite risultano recalcitranti.



2. Foto di Loredana Moffa (CREA VE)

Tuttavia, **sono state trasformate le varietà di Chardonnay, Pinot noir, Sangiovese e il portinnesto 110 Richter**. In pesco si segnalano pochissimi casi di successo e, in specie come mandorlo e albicocco, non ci sono evidenze scientifiche che riportano l'applicazione di TEA.

### 3. Non vedere i “frutti” delle TEA può essere un problema, ma è possibile sfruttare queste tecnologie per anticipare la fioritura

Il limite che accomuna tutte le specie arboree da frutto è la lunga **giovanilità**, ovvero il tempo che porta alla produzione dei frutti, partendo dall'innesto di una porzione giovane modificata. Questa fase può essere **lunga 3-8 anni in pesco, kiwi, castagno, melo, e fino a 10 negli agrumi**. È comprensibile che in questi casi – se l'utilizzo delle TEA è indirizzato al miglioramento della qualità dei frutti – sia necessario trovare una immediata soluzione per ridurre tempi così lunghi; diversamente, anche la verifica del tratto modificato potrebbe vanificare l'utilizzo delle TEA.

Negli agrumi, così come in pesco, il gene *CEN/TFL* è stato utilizzato per anticipare la fioritura, tentando di riproporre quanto già dimostrato in precedenza in kiwi, oppure quanto è possibile che si verifichi anche in natura per agrumi (**FOTO 3**). **L'ideale sarebbe disegnare dei costrutti in grado di fare editing sia per produrre precocemente fiori sia per migliorare la qualità dei frutti.**

3. Foto di Marco Caruso (CREA OFA)

## L'Italia impegnata a sviluppare alberi da frutto marker-free

Un aspetto che attanaglia la comunità scientifica europea riguarda l'ambito legislativo. Attualmente le piante cisgeniche ed editate vengono sottoposte al rispetto della Direttiva 2001/18/CE, la stessa valida per le piante geneticamente modificate. Il dibattito è attivo e in divenire, ma a tutt'oggi non è consentita la sperimentazione su piante editate in pieno campo, limitazione che non consente di osservarle e analizzarle nel loro ambiente naturale. In attesa di una proposta legislativa comunitaria sulle TEA, anche i ricercatori italiani si sono adoperati per eliminare la presenza di DNA estraneo nella pianta migliorata, utilizzando dei sistemi (come FLP/Frt) che consentono la rimozione del DNA in cui risiedono gli elementi essenziali per operare le modifiche



genetiche (come, ad esempio, la proteina Cas e i geni di resistenza all'antibiotico kanamicina, entrambe sequenze estranee alla pianta) a seguito di uno shock termico.

In questo modo la pianta editata o cisgenica conterrà esclusivamente la modifica nel gene che controlla il carattere di interesse. In melo, come in arancio, questo approccio è stato sviluppato e ha portato, rispettivamente, alla produzione di piante resistenti alla ticchiolatura e a piante con frutti potenzialmente arricchiti in antocianine e licopene.

## **Cosa ci attendiamo dal domani?**

Gli sforzi compiuti dalla ricerca italiana – sia dal punto di vista economico che attraverso il miglioramento della conoscenza – e i risultati sinora ottenuti sono pubblicamente disponibili in tutto il mondo. Ma la legislatura vigente limita lo sfruttamento delle TEA in Europa, causando gravi ripercussioni sulle iniziative nazionali e sui programmi internazionali indirizzati a mitigare gli effetti dei cambiamenti climatici (es. Farm to Fork, New Green Deal). Intanto, però, altrove nel mondo si continua a beneficiare sia delle opportunità di finanziamento sia dello sfruttamento in campo dei prodotti della ricerca.



# La filiera agroalimentare per le TEA: ecco il position paper

Di Mauro Fontana



In che modo le TEA possono accrescere la sostenibilità della nostra agricoltura, migliorando la resistenza alla siccità e alle avversità, assicurando al contempo qualità e produttività più elevate e alimenti più salutari? Scopriamo insieme il position paper “Nuove tecniche genomiche genome editing e cisgenesi” presentato dal Cluster A.grifood Nazionale CL.A.N., CREA e Federchimica Assobiotech.

Per la prima volta, i rappresentanti del mondo produttivo, della ricerca e delle istituzioni si sono incontrati per promuovere un sistema pubblico-privato di miglioramento genetico, basato sulle tecnologie genomiche più avanzate, strategico per far vincere all'agroalimentare nazionale la sfida del futuro, mantenendone sostenibilità e competitività.

Durante l'evento, svoltosi recentemente a Roma, è stato illustrato il position paper “Nuove tecniche genomiche genome editing e cisgenesi”

## Il position paper “Nuove tecniche genomiche genome editing e cisgenesi”

Il position paper illustra le potenzialità e le opportunità che le TEA possono offrire all'agricoltura italiana per essere sostenibile, produttiva, competitiva sui mercati, senza rinunciare a quella qualità e a quella tipicità che rendono unico il nostro Made in Italy.

Tutto ciò è possibile selezionando già oggi nuove varietà adatte al clima che verrà domani, meno bisognose di acqua, resistenti alle malattie e più efficienti nell'uso dei fertilizzanti. Per consentire all'Italia di cogliere tali opportunità, rimanendo al passo con il resto dell'Europa e del mondo, all'interno del position paper – elaborato dal Cluster Agrifood Nazionale, dal CREA e da Federchimica-Assobiotech – sono contenute alcune richieste:

Consentire la sperimentazione in campo delle TEA, che al momento è ancora preclusa

Rilanciare, attraverso un forte investimento, un programma di ricerca sulle biotecnologie per l'agricoltura di domani predisporre strumenti di trasferimento tecnologico dei risultati dalla ricerca al mondo produttivo per selezionare nuove varietà e ibridi.

*A cura di Micaela Conterio*

elaborato dal Cluster Agrifood Nazionale

## Il Cluster Agrifood Nazionale: chi siamo?

Il Cluster Agrifood Nazionale (CL.A.N.) è un'Associazione riconosciuta multistakeholder che aggrega Imprese, Associazioni di categoria, Università, Organismi di ricerca, Enti di Formazione e Rappresentanze territoriali, che operano nel settore Agrifood.

Nasce per promuovere, difendere e incrementare lo sviluppo della filiera agroalimentare dalla produzione agricola, alla trasformazione, ai settori industriali correlati, attraverso lo stimolo dell'innovazione, la valorizzazione dei risultati della ricerca, la creazione di nuove competenze, la collaborazione tra ricerca, imprese, istituzioni e amministrazione pubblica.

Il MUR riconosce al Cluster CL.A.N. il ruolo di cabina di regia e interlocutore unico nella relazione con le Istituzioni nazionali ed europee in materia di ricerca e innovazione per il settore agroalimentare.

(l'associazione riconosciuta dal Ministero dell'Università e della Ricerca che aggrega Imprese, Associazioni di categoria, Università, Organismi di ricerca, Enti di Formazione e Rappresentanze territoriali che operano nel settore Agrifood), dal CREA e da Federchimica-Assobiotech.

Al fine di illustrare e condividere tale opportunità, il Cluster Agrifood Nazionale CL.A.N., CREA e Federchimica Assobiotech hanno redatto un documento congiunto di posizionamento denominato “NUOVE TECNICHE GENOMICHE GENOME EDITING e CISGENESI (ovvero TEA Tecniche di Evoluzione Assistita)” che approfondisce e documenta il tema.

Nell'attuale complicatissimo periodo storico, alla luce anche delle evidenze scientifiche che testimoniano l'estrema gravità delle problematiche connesse al cambiamento climatico, il ruolo dell'agricoltura risulta essere nevralgico per raggiungere una sostenibilità reale, non quella troppo spesso sbandierata e non sostanziata da effettive pratiche rispettose dell'ambiente.

Oggi più che mai al settore agricolo italiano è richiesto di produrre maggiori quantitativi di cibo, mantenendo un livello qualitativo di eccellenza, in ragione anche del prestigio del Made in Italy ha a livello globale. Al tempo

stesso, però, il comparto deve rispondere a numerosi e complessi regolamenti europei/nazionali/regionali, che prevedono limitazioni drastiche per l'uso di concimi e fitofarmaci per le colture.

Ma a questo punto è necessario porsi due domande fondamentali:

- Come può la filiera agroalimentare italiana riuscire ad affrontare con successo le sfide richieste dalla collettività a fronte delle emergenze climatiche attuali?
- Quali possono essere gli strumenti concreti che l'agricoltura deve mettere in campo per conciliare la redditività delle imprese con le attuali e future normative?

Sicuramente le TEA offrono strumenti con cui sarà possibile migliorare la produttività, la qualità e la sostenibilità delle coltivazioni, permettendo nello stesso tempo di tutelare e valorizzare il patrimonio di agrobiodiversità dei nostri territori, minacciato dai cambiamenti di temperature e di piovosità, che stanno creando habitat ostili per le colture.

L'Italia, attraverso la emanazione di una legge *ad hoc* che possa dare evidenza dell'enorme opportunità offerta dalle moderne biotecnologie TEA, potrà sicuramente mettere nelle migliori condizioni il sistema pubblico-privato dell'AgriFood di rispondere in maniera più efficace alle esigenze espresse dall'opinione pubblica, consentendo alle imprese di contenere l'uso di sostanze chimiche, ottimizzandone il relativo impiego e preservando la competitività del "Made in Italy".

Il sistema agroalimentare italiano, oramai, concorda sulla necessità di non poter più assimilare piante ottenibili tramite le TEA – che non contengono DNA di altri organismi e che non fanno altro che replicare processi che potrebbero avvenire anche in natura – a quelle piante transgeniche OGM, in cui si ricorre anche al passaggio di patrimonio genetico tra regni diversi.

Tramite le TEA si cercherà, in tempi estremamente vantaggiosi, di ottenere varietà caratterizzate da una migliore capacità di adattamento al nuovo clima, una più spiccata resistenza alle malattie ed un più efficiente utilizzo dell'acqua e dei fertilizzanti somministrati.

## Cos'è un Position Paper?

Un Position Paper è un documento di posizionamento strategico elaborato da un'organizzazione, o di un gruppo di interesse costituito, per esporre in maniera sintetica il proprio punto di vista su uno specifico tema ritenuto prioritario. Usualmente viene adottato in ambito istituzionale, al fine di illustrare scenari di attualità e presentare proposte ai policy maker.

Consulta il Position Paper sulle TEA di CREA, CLAN e Assobiotec: [link P.P.](#)

Guarda la registrazione dell'evento sulle TEA del 14 marzo 2023 <https://www.youtube.com/watch?v=fRo4jqjXUyk>



# Frumento: tra nutrizione e resistenza alle malattie

Di Marone / Pecchioni



Maggiore resistenza alle malattie, quali ruggini fogliari e oidio, maggior efficienza d'uso dell'azoto, miglior profilo nutrizionale rendendo inattivo il peptide (frazione proteica tossico del glutine e riducendo il livello di fattori anti-nutrizionali presenti nella granella, più elevata qualità panificatoria. Tutto ciò è reso possibile grazie alle TEA, cisgenesi e genome editing, applicate al frumento. Scopriamo insieme a che punto è la ricerca, in particolare quella del CREA Cerealicoltura e Colture Industriali

L'utilizzo delle nuove Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) consente di accelerare in maniera mirata i programmi di miglioramento genetico, aumentando le rese e migliorando la qualità delle produzioni, in un'ottica di sostenibilità e di risparmio delle risorse. Poiché la regolamentazione limita fortemente la coltivazione e la commercializzazione delle piante transgeniche e, in aggiunta, anche l'accettazione da parte dei consumatori rimane bassa, l'approccio della **cisgenesi**, nell'ambito delle TEA, può rappresentare un metodo efficiente per introdurre in pianta geni provenienti dalla stessa specie o da specie strettamente correlate e per accelerare il miglioramento genetico del frumento.

## Il frumento

Il **frumento** è un cereale appartenente al genere *Triticum* e alla famiglia delle Graminacee. Originariamente veniva coltivato tra il Mar Mediterraneo, Mar Nero e Mar Caspio. Attualmente, viene coltivato in tutti i continenti e, in Italia, rappresenta il cereale più coltivato (1.700.000 ettari in totale nel 2022). In particolare, nel Nord Italia viene più coltivato il frumento tenero da cui si ottiene la farina per la produzione di pane e prodotti da forno mentre il frumento duro, che si presta meglio per la produzione di semola e la trasformazione in pasta, è coltivato nelle regioni del Sud Italia, in particolare nel "Granaio d'Italia". Nel 2012 è stato consegnato il primo riconoscimento IGP (Indicazione Geografica Protetta) alla pasta di Gragnano, mentre sono noti i marchi DOP per alcuni pani del Sud come il pane di Altamura e la pagnotta del Dittaino. Le produzioni totali secondo i dati ISTAT 2022 sono 3,7 milioni di tonnellate per il frumento duro e 2,8 milioni di tonnellate per il frumento tenero.

La produzione nazionale, tuttavia, copre circa il 60 % dei nostri fabbisogni per il grano duro, mentre si attesta al 35 % – 40 % per il tenero: di conseguenza, è inevitabile l'importazione di notevoli quantità di frumento da altri Paesi comunitari ed extracomunitari. Nel 2021 l'Italia ha importato oltre 2,2 milioni di tonnellate di frumento duro e oltre 4,5 milioni di tonnellate importate di frumento tenero. Quasi il 46% del frumento duro è stato importato dal Canada, seguito da Grecia per il 6%, USA e Francia per il 7% e Kazakistan per il 3%. Per quanto riguarda il grano tenero, il principale esportatore è stato l'Ungheria, con il 23% sul totale importato, seguito dalla Francia, con il 16%.

L'approccio cisgenico è stato usato, al momento, in frumento duro per ottenere una varietà con una migliore qualità panificatoria, e in frumento tenero per ottenere piante più resistenti alle malattie, grazie al trasferimento di un gene coinvolto nella difesa da patogeni fungini. Il CREA-Cerealicoltura e Colture Industriali sta conducendo attualmente prove di resistenza a malattie fungine su piante cisgeniche di frumento duro in cui è stato trasferito un gene da frumento tenero, *Lr67*, che è in grado di conferire resistenza durevole in pianta adulta a tutte le ruggini fogliari e all'oidio, malattie che determinano una notevole perdita di produzione, anche del 50%.



A sinistra: piante di frumento duro suscettibili all'oidio. A destra: piante resistenti all'oidio, ottenute mediante cisgenesi. (Foto di Daniela Marone)

Pertanto, **rendere il frumento più resistente alle malattie rappresenta un ottimo modo per aumentare le rese garantendo, allo stesso tempo, la sostenibilità ambientale grazie al ridotto uso di pesticidi.**

Uno strumento molto efficace è inoltre il **Genome Editing (GE)**, una tecnica che induce mutazioni in posizioni specifiche del genoma. Utilizzando questa strategia è stata ottenuta **una maggiore resa nel frumento tenero, editando un gene coinvolto nell'efficienza d'uso dell'azoto (NUE)**. Le linee editate hanno mostrato un aumento della tolleranza a carenze di azoto, un aumento della NUE e della resa in granella, anche in prove di pieno campo.

Il GE è stato utilizzato con successo anche per migliorare la resistenza ai patogeni. Il miglioramento della **resistenza all'oidio in frumento tenero** è stato ottenuto mediante la modifica di due geni che nella loro forma nativa favoriscono l'azione del patogeno. **Sono state così ottenute piante con una robusta resistenza alla malattia senza effetti secondari indesiderati e penalizzazione della resa.**

Alcune recenti applicazioni del GE hanno riguardato il miglioramento della qualità dei frumenti, intervenendo, in particolare, sui macronutrienti come l'amido e le proteine della granella.

**Frumenti caratterizzati da un migliorato profilo nutrizionale, grazie ad una maggiore frazione di amido resistente**, sono stati ottenuti per mutagenesi mirata di un enzima coinvolto nella sintesi dell'amido. Essendo l'amido resistente un **componente principale della fibra alimentare**, che non viene digerita e assorbita nello stomaco o nell'intestino tenue, con conseguente diminuzione del livello di zucchero nel sangue dopo i pasti, il suo aumento ha effetti positivi sulla salute umana.

Nell'ambito della composizione delle proteine del glutine, le gliadine rappresentano la frazione proteica maggiormente coinvolta nella **celiachia**, un'inflammation permanente dell'intestino che è diffusa nell'1-2% della popolazione. In particolare, in **frumento tenero il principale peptide ( frammento proteico) tossico è rappresentato da una regione presente nelle alfa-gliadine**. Mediante un approccio mirato, è stato possibile **"inattivare"** questo peptide, **riducendo l'immunoreattività dell'85%, senza alterare la qualità tecnologica delle farine**.

In **frumento duro**, invece, il principale peptide tossico è presente in copie multiple nelle gamma-gliadine. Il CREA-CI sta attualmente impiegando un **approccio di genome editing** per modificare questo **peptide tossico**, trasformandolo in una **sequenza protettiva** che, in esperimenti condotti sia *in vitro* che *ex vivo*, si è dimostrata efficace nel **prevenire le reazioni avverse indotte dalle proteine del glutine**.

La qualità nutrizionale e salutistica dei frumenti può essere migliorata anche **riducendo il livello di fattori anti-nutrizionali presenti nella granella**. Tra questi si ritrova **l'asparagina, precursore dell'acrilamide prodotta negli alimenti amidacei durante la cottura ad alte temperature e in grado di incrementare il rischio di sviluppare il cancro nell'uomo**. Mediante il silenziamento del gene coinvolto nella sintesi dell'asparagina sono state ottenute linee di frumento che presentavano una riduzione fino al 90% della concentrazione di asparagina libera nella granella. Nel 2021, nel Regno Unito sono state autorizzate prove di campo per la valutazione di queste linee.

Inoltre, negli Stati Uniti la compagnia Calyxt, operante nel settore delle biotecnologie, ha sviluppato un **frumento editato ad alto contenuto di fibre, con l'intento di arrivare a fornire fino al 100% del fabbisogno giornaliero raccomandato di fibre**. Questo frumento è in corso di valutazione in prove di campo con l'intento di inserirlo al più presto nel mercato. Tra gli altri prodotti che la stessa azienda sta sviluppando, sempre attraverso GE, vi è anche un frumento a ridotto contenuto di glutine.

La misura in cui le colture ottenute con il GE possono essere sviluppate, coltivate e commercializzate, anche per usi nell'alimentazione umana e animale, dipende in gran parte da come esse sono regolamentate a livello internazionale e nazionale, data la variabilità delle normative applicate dai vari Paesi.



La comunità scientifica sta ora chiedendo ai governi dei paesi in cui le piante modificate da GE sono considerate per legge organismi geneticamente modificati, tra i quali l'Unione Europea e in particolare l'Italia, di prendere in considerazione una diversa regolamentazione poiché, a seguito di cicli di incrocio e selezione, si ottengono piante completamente prive di DNA estraneo e recanti solo le mutazioni desiderate nel/i gene/i bersaglio, con fenotipi assolutamente simili a quelli ottenuti tramite mutazioni tradizionali (naturali o indotte chimicamente/fisicamente) negli stessi geni.

Se solo si pensa alle innovazioni introdotte, all'inizio del secolo scorso, dal genetista italiano Nazareno Strampelli, pioniere della Rivoluzione Verde nel dopoguerra, che hanno portato la cerealicoltura italiana ad essere competitiva, oggi, grazie al sequenziamento del genoma di frumento duro italiano ci sarebbero tutte le premesse per un utilizzo efficace delle TEA, senza modificare i tratti fenotipici su cui si basa il Made in Italy, riducendo le perdite di produzione e conservando la qualità del frumento.

*Hanno collaborato: Anna Maria Mastrangelo, Donatella B.M Ficco, Daniela Trono, Grazia M. Borrelli*

# Riso: nuovi orizzonti della ricerca

Di Vaccino / Sansoni / Bianchi/ Pecchioni



Ricco in fibre e vitamine, potassio e acidi grassi essenziali, privo di glutine, e quindi ideale per l'alimentazione di soggetti intolleranti e celiaci, il riso è da sempre simbolo del Made in Italy, con l'Italia leader assoluto in Europa e negli areali mediterranei. E' il terzo cereale più coltivato al mondo, pertanto, le opportunità offerte dalle TEA sono enormi e potrebbero velocizzare e rendere più precisi tutti i programmi di miglioramento varietale del riso, ottenendo cultivar più "attrezzate" a produrre sostenibilmente in condizioni di scarsità d'acqua e cambiamenti climatici.

Negli ultimi anni il consumo di riso è aumentato, si stima del 34% tra 2012 e 2022 (Ente Risi), in Italia e all'interno dell'Unione Europea. Questo incremento si può ricollegare a diversi fattori. Il riso è un primo piatto alternativo alla pasta, adatto a diverse ricette, anche estive, ed è alimento privo di glutine, quindi ideale per l'alimentazione di soggetti intolleranti al glutine e celiaci. Inoltre, in uno studio recente svolto da Ente Risi in collaborazione con l'Università degli Studi di Pavia e il Politecnico di Torino, è stato evidenziato come molte varietà di riso italiane siano caratterizzate da un Indice Glicemico molto basso, rendendo questo alimento più indicato di altri alimenti amidacei per persone affette da varie patologie, come ad esempio il diabete. Infine, la popolarità della cucina asiatica e l'aumento della scelta di alimenti per i consumatori hanno sicuramente aumentato il consumo medio di questo cereale. La ricerca scientifica, a fronte della sempre crescente popolarità del riso, non è rimasta ferma. Gli obiettivi del miglioramento genetico del riso sono stati, e rimangono, l'incremento della capacità produttiva, l'aumento di resistenza alle malattie, la riduzione del ciclo colturale e della taglia e, più recentemente, gli aspetti merceologici e qualitativi del prodotto, e la lotta all'infestante nota come "riso crodo".

## L'importanza del riso

Il riso (*Oryza sativa*) è il terzo cereale più coltivato al mondo, dopo mais e frumento. I dati più aggiornati della FAO, relativi al 2021, riferiscono una produzione di circa 787 milioni di tonnellate su una superficie di 165 milioni di ettari. L'Italia è primo produttore e assoluto protagonista della produzione di riso in Europa: nel 2021 l'area dedicata alla coltivazione del riso è stata di 227.000 ettari, con una produzione di circa 1,4 milioni di tonnellate, valori pressoché immutati negli ultimi 20 anni. La coltivazione è ristretta principalmente alle province di Pavia, Novara e Vercelli, in cui è concentrato il 90% della produzione nazionale (Figura 1). Nonostante il panorama varietale sia molto ampio (264 sono le varietà attualmente iscritte al Registro Nazionale), più del 60% della superficie è occupata da solo dieci varietà (dati 2022, Ente Nazionale Risi).

La ricerca, nel corso degli anni, ha perseguito tali obiettivi avvalendosi delle tecnologie via via disponibili, fino all'invenzione delle cosiddette Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), in particolare il sistema di forbici molecolari CRISPR-Cas9, che ha valso il premio Nobel per la chimica nel 2020 alle scienziate Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier. Questo approccio ha un considerevole vantaggio rispetto alle precedenti tecniche di miglioramento genetico: agire in maniera mirata e precisa sui singoli geni, generando in essi solo piccoli cambiamenti, anche di una sola lettera del codice. I geni così mutati, anche detti "editati", consentono di migliorare un carattere desiderato, spesso in tempi molto rapidi.



## Le TEA nel riso

Le prime applicazioni delle TEA in riso risalgono al 2013, quando ricercatori asiatici sono stati in grado, in modo quasi pionieristico, di mutare delle piante della varietà Nipponbare per modificare il contenuto di clorofilla o l'architettura della pianta. Attualmente, **vari aspetti della pianta sono studiati mediante le TEA, dai caratteri morfologici fino alla qualità merceologica e nutrizionale**. Infatti, tali tecnologie sono anche utili per studiare le funzioni dei geni sull'espressione dei caratteri.

**Morfologia della pianta.** L'architettura della pianta di riso è cruciale per la resa: si stima che **un'architettura ottimale includa un basso numero di culmi di accestimento, cioè di steli (culmi) che appartengono a una singola pianta, quindi avendone pochi non produttivi. Inoltre, essa dovrebbe possedere culmi più spessi e**



**robusti, per ridurre l'allettamento a terra, e un numero maggiore di granelli per pannocchia.** Un gene di fondamentale importanza in questo contesto è sicuramente *IPA1* (*Ideal Plant Architecture1*, ovvero pianta dall'architettura ideale): con una tecnica TEA è stata causata una delezione, ovvero è stato "tagliato" un breve tratto di DNA in modo che quella regione non sia più funzionale; ciò ha portato ad un aumento del peso delle pannocchie e del numero di culmi prodotti,



**Figura 2** – A) e B): nella foto, a sinistra la variante di riso nativa, a destra quella editata con le TEA. Come si può notare le piante mutate risultano avere più culmi e un peso della pannocchia maggiore. Foto da Song et al., 2022.

e quindi ad un aumento della produttività della pianta. Un altro gene importante oggetto delle TEA è *TAC1* (*Tiller Angle Control 1*), che influenza l'angolazione dei culmi laterali della pianta. In un esperimento che si è avvalso di tali tecniche, il gene è stato mutato in modo da essere silenziato (ovvero reso pressoché inattivo); ciò ha indotto alla crescita di piante con un'architettura più desiderabile e compatta, ideale per colture più fitte di piante, senza perdere in resa.

Un altro aspetto importante riguardante la morfologia della pianta è l'altezza, che è stata via via diminuita con il miglioramento genetico: **piante più basse sono infatti più resistenti all'allettamento a terra della pianta di riso.** Tantissimi gruppi di ricercatori ancora oggi si concentrano sullo studio di questo carattere in riso con risultati spesso molto incoraggianti.

**Resistenza ai patogeni.** Come poter contrastare le malattie da cui il riso è afflitto è sempre stato un elemento centrale della ricerca sul riso, guidandone buona parte degli sforzi. **Il brusone** (*Pyricularia oryzae*) è sicuramente tra le infezioni fungine del riso più diffuse e dannose per gli agricoltori, causando danni anche molto ingenti alla produzione finale. Le TEA sono state utilizzate, in questo contesto, per disattivare un gene di riso, che rappresenta la chiave di ingresso per il fungo nella pianta, ostacolandone quindi l'infezione. Le piante così ottenute hanno mostrato, in esperimenti sia in campo aperto che in ambiente controllato, di avere inalterate tutte le qualità agronomiche della pianta base, ma un grado di infezione decisamente più basso e quindi **una resistenza alla malattia più marcata**, aprendo la strada, quindi, all'utilizzo delle TEA per eliminare o ridurre i trattamenti con fitofarmaci contro il brusone, e aumentare in questo modo la sostenibilità della coltura

**Caratteri agronomici.** L'aumento della resa del riso è un argomento delicato: dopo un aumento considerevole durante la Rivoluzione Verde, questa spinta positiva si è molto rallentata. Negli ultimi 60 anni la resa è

passata da un raccolto medio di 5 t/ha (1961-1970) a poco meno delle odierne 7 t/ha (2019). Ci sono molti colli di bottiglia, che impediscono un aumento maggiore della produzione di riso per unità di superficie, ma la ricerca non si è fatta scoraggiare e ha continuato la sperimentazione. Recentemente nuove scoperte sul gene *NAC23* (*No Apical Meristem23*, ovvero nessun meristema apicale) danno nuove speranze: **mutando parti della sequenza di questo gene si sono ottenute piante con una produzione media superiore del 15% rispetto a quelle non editate.**

Grazie alle varie tecniche scientifiche disponibili, e tra loro le TEA, è stato possibile scoprire e confermare la funzionalità di molti geni legati alla fioritura del riso, su come essa sia regolata e su come funzioni tutto il sistema. Queste nozioni, apparentemente solo teoriche, sono di rilevante importanza agronomica. Grazie all'individuazione di geni, o di varianti geniche ("versioni" alternative dello stesso gene, che producono effetti un po' diversi) che conferiscono le caratteristiche desiderate, si apre infatti la possibilità di modulare tali caratteristiche in varietà che ne sono prive.

Il riso ha una scarsa efficienza nell'uso dei fertilizzanti: infatti si stima che solo il 30-50% del prodotto fertilizzante applicato in campo sia effettivamente utilizzato dalle piante. Il gene *NRT1.1B* (*Nitrate Transporter*, ovvero trasportatore di azoto sotto forma di nitrato, dal suolo alle radici) aumenta l'efficienza di assorbimento del nitrato da parte della pianta. Tale gene è stato identificato e descritto per la prima volta nelle varietà di riso tropicali del tipo *indica*, che sono note per il loro migliore uso dell'azoto rispetto alle *japonica*, usate nel contesto italiano ed europeo. Con una tecnica TEA, sostituendo una singola "lettera" del codice del DNA del gene di una varietà *japonica*, si è ottenuta la stessa variante già esistente nelle varietà *indica*. I risultati sono stati quelli attesi: **la nuova pianta *japonica* ha mostrato di avere un assorbimento del fertilizzante più efficiente.**

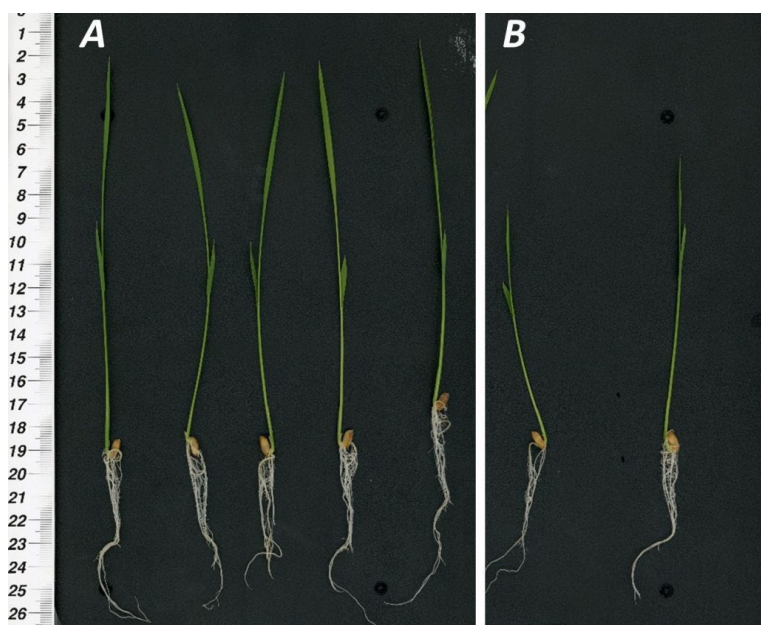
Con i cambiamenti climatici in atto, e l'allarmante esperienza della stagione 2022, la siccità, o comunque la scarsità d'acqua, spesso associata all'aumento della salinità dei suoli, diventa un punto critico per la coltivazione risicola. La ricerca da anni si sta impegnando per trovare soluzioni a questo problema. **La scoperta del gene *DRO1* (*DEEPER ROOTING1*, ovvero "radici più profonde") è stata importantissima, in quanto ha dimostrato di poter rendere l'apparato radicale della pianta più massivo e più profondo, aiutando quindi la pianta a resistere a situazioni di scarsità idrica.** Lo studio del gene mediante le TEA ha consentito di descrivere con maggiore accuratezza la sua funzionalità, spianando la strada per la sperimentazione futura.

**Qualità.** La qualità merceologica del riso è sicuramente un fattore importante per gli agricoltori in quanto impatta fortemente il potenziale economico del lavoro svolto. Tra le caratteristiche importanti da considerare c'è **il rapporto tra amilosio e amilopectina del chicco, una caratteristica che influenza la consistenza e la tenuta di cottura**, oltre che un fattore da considerare se il materiale deve essere sottoposto a parboilizzazione o pre-cottura. In riso, il contenuto di amilosio è controllato dal gene *Waxy*. Mediante le TEA tale gene è stato mutato, in modo da poter modulare la sua attività, regolando quindi il contenuto in amilosio. Tale scoperta offre la possibilità di adattare il prodotto alle esigenze del mercato. Un altro fattore importante per la qualità di un prodotto è sicuramente **il gusto**. In quest'ottica si sono sfruttate le tecniche TEA per migliorare varietà non aromatiche in modo che producessero composti aromatici, inserendo il gene *BADH2* proveniente da altre varietà apprezzate per questa caratteristica. Una caratteristica peculiare del riso *Oryza rufipogon*, la variante selvatica del riso coltivato, sono i suoi semi rossi, che possiedono un alto contenuto di antocianine, composti ben noti per le loro proprietà benefiche. Le varietà di riso a granella bianca possiedono lo stesso gene di *Rufipogon*, ma con un "errore" che lo rende inattivo; da qui il colore pallido della granella. Con una tecnica TEA è stato corretto l'errore, riportandolo allo stato originale (tutt'ora presente nella specie *rufipogon*): il risultato è una pianta con caratteristiche agronomiche delle varietà moderne pressoché immutate, ma che producono chicchi rossi, una caratteristica sicuramente molto interessante per il consumatore.

## L'esperienza del CREA con le TEA nel Riso

All'interno del progetto BIOTECH finanziato dal Masaf e coordinato dal CREA, il CREA Cerealicoltura e Colture Industriali ha avviato un programma di miglioramento genetico mediante le TEA (con il sottoprogetto SUSRICE). Nell'ambito di SUSRICE le TEA sono state applicate su tre geni di riso, nelle varietà del CREA Vialone Nano e Roma, con l'obiettivo finale di realizzare un **nuovo ideotipo di pianta, con migliorata resilienza e sostenibilità. In particolare, le attività sono state focalizzate su tre geni precedentemente descritti: *DRO1*, che influenza l'angolo di crescita delle radici, allo scopo di renderle più profonde, migliorando quindi l'efficienza di uso dell'acqua, *NRT1.1B*, che aumenta l'efficienza di assorbimento del nitrato, per migliorare quindi l'efficienza di uso dell'azoto, e *IPA1*, che regola l'architettura della pianta, per migliorarne la capacità produttiva.** I risultati dell'attività, svolta in collaborazione con (il gruppo di ricerca del professor Fabio Fornara del) l'Università di Milano, sono molto incoraggianti. Le piante di Vialone Nano e Roma trasformate hanno prodotto semi dai quali sono state generate piantine, che sono in corso di valutazione per i caratteri oggetto di miglioramento.

Per quanto riguarda il gene per il trasportatore di nitrato, *NRT1.1B*, ad esempio, le prime valutazioni sono molto incoraggianti. In Figura 3 si può osservare la differenza di crescita della varietà Roma nativa (a destra) rispetto alla stessa varietà "editata" (a sinistra), al decimo giorno dalla messa a germinazione in un terreno liquido contenente nitrato come fonte di azoto. Nonostante il test sia da confermare con ulteriori prove, è



evidente il maggiore vigore, in termini di lunghezza sia del culmo, sia delle radici, nelle piantine "editate" con le TEA (A).

**Figura 3** – Differenza di crescita della varietà Roma (B), rispetto alla stessa varietà con la variante editata del gene *NRT1.1B* (A), al decimo giorno dalla semina in un terreno liquido contenente nitrato come fonte di azoto. Si può notare come, a parità di tempo e condizioni di crescita, le piantine editate abbiano gli apparati radicale e vegetativo più sviluppati.

Se i risultati preliminari saranno confermati, oltre che in laboratorio, anche in pieno campo, (non appena sarà possibile), le piante così migliorate potranno davvero contribuire in modo significativo alla sostenibilità e

competitività della risicoltura, e al raggiungimento degli obiettivi del *Green Deal* e della strategia *Farm to Fork*, che sono al centro delle attuali priorità dell'UE.

In conclusione, la comunità scientifica si sta da sempre impegnando per offrire soluzioni al mondo dell'agricoltura, anche con l'applicazione di nuove tecnologie come le TEA, che necessitano però ancora un riconoscimento legislativo a livello europeo e quindi nazionale. **Le opportunità offerte dagli avanzamenti della conoscenza scientifica sono enormi e potrebbero potenzialmente velocizzare e rendere più precisi tutti i programmi di miglioramento varietale del riso, con nuove varietà più "attrezzate" a produrre sostenibilmente in condizioni di scarsità d'acqua e cambiamenti climatici.** Una popolazione mondiale che ha già raggiunto gli 8 miliardi persone e non dà segni di fermarsi, almeno fino al 2050, impone di investire in ricerca, per tutte le possibilità che essa già offre e che potrà offrire.



# Vite: il primato italiano

Di Nerva / Velasco / Chitarra



Per preservare il patrimonio della viticoltura italiana in un contesto ambientale estremamente mutevole, lo sviluppo delle tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) per il miglioramento genetico sostenibile è diventato un imperativo ineludibile per ottenere vigneti di alta qualità, resilienti agli stress e a basso impatto anche per l'uomo e gli animali.

L'Italia e il CREA in particolare sono all'avanguardia negli studi e ricerche per l'applicazione e l'ottenimento di varietà migliorate di vite.

La viticoltura in Italia riveste un'importanza fondamentale sia dal punto di vista storico che economico rappresentando **un patrimonio inestimabile**, un connubio tra tradizione, territorio, economia e cultura. È un settore che merita di essere preservato, sostenuto e promosso, poiché contribuisce in modo significativo al prestigio del Paese e alla sua identità nel mondo. Per preservare al meglio questo patrimonio nazionale bisogna tenere in considerazione che il cambiamento climatico rappresenta una minaccia sempre più pressante per la viticoltura in tutto il mondo, compresa l'Italia. Questo fenomeno globale ha **conseguenze dirette sulla coltivazione della vite e sulla produzione di uva di qualità**, con un impatto che è strettamente correlato alla capacità di sviluppare nuove pratiche a ridotto impatto ambientale. **L'agricoltura sostenibile è diventata quindi un imperativo** e le pratiche agricole tradizionali dovranno essere adattate per ridurre l'impatto ambientale e per mitigare gli effetti del cambiamento climatico, attraverso investimenti in ricerca, tecnologie innovative e pratiche agricole che favoriscano vigneti resilienti agli stress e a basso impatto anche per l'uomo e gli animali.

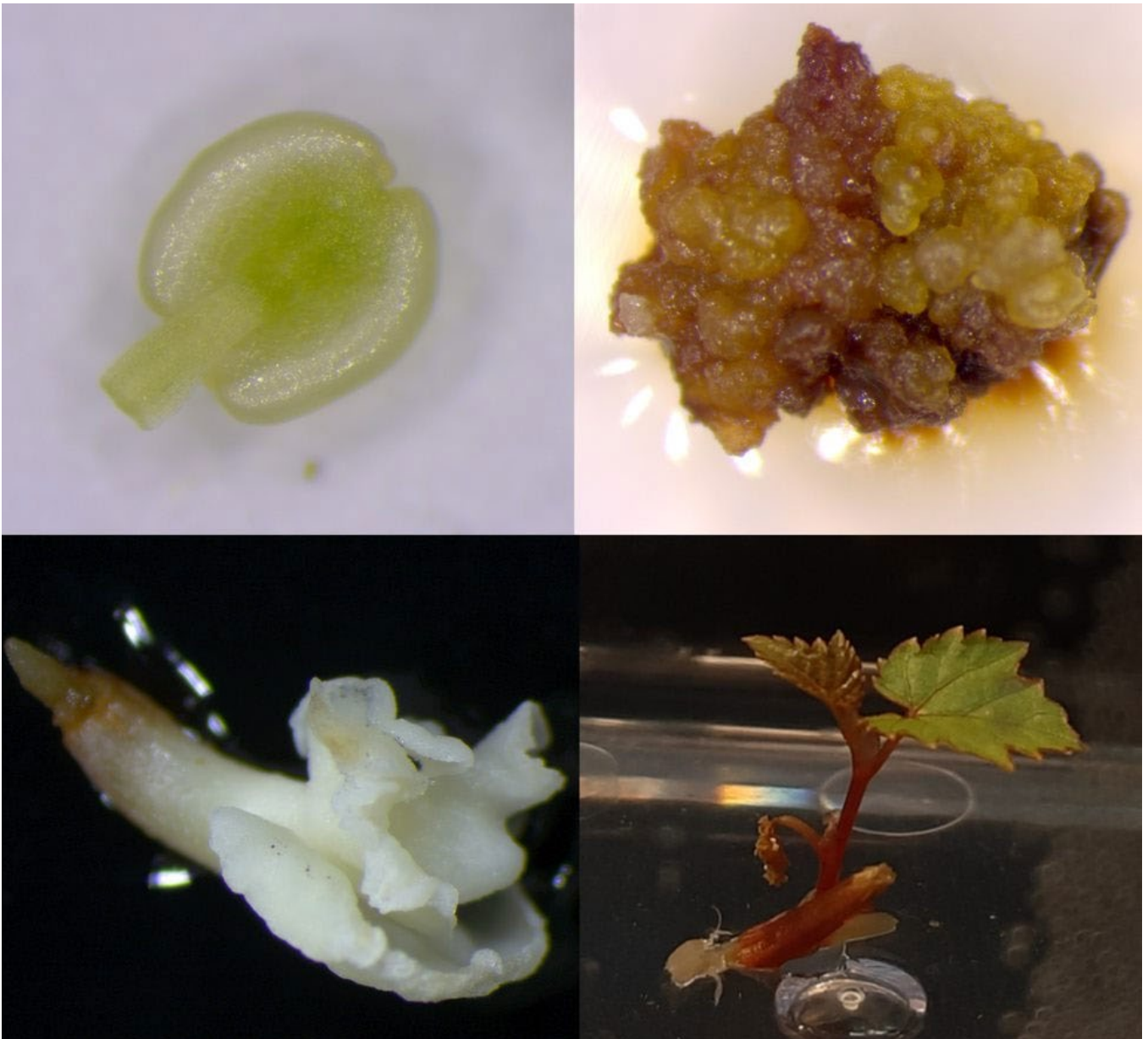
## Le sfide che ci attendono

Fra le strategie di adattamento al cambiamento climatico, **lo sviluppo di genotipi migliorati**, che siano resilienti agli stress ambientali, rappresenta una delle soluzioni attualmente disponibili più importanti. La difficoltà nell'applicazione del miglioramento genetico in viticoltura è principalmente legata a due fattori, da un lato la necessità di dover attendere lo sviluppo di **lungi stadi giovanili** in cui la pianta non produce frutti e

dall'altro la **perdita delle caratteristiche peculiari** della varietà originale che si intende migliorare. Quest'ultimo aspetto risulta fondamentale per la diffusione sul territorio della nuova varietà ottenuta poiché, non potendo mantenere il nome originale, non sarà utilizzabile, se non in piccole quantità, nei disciplinari che regolano la produzione di vini noti e ricercati dai consumatori.

In questo frangente, l'applicazione delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) potrà fornire un nuovo strumento in grado di rivoluzionare il miglioramento genetico in viticoltura. Infatti, con l'applicazione di queste tecnologie **le modifiche introdotte nei genomi delle piante sono minime**, se confrontate con quelle derivanti dalle strategie di miglioramento genetico tradizionale. Nel caso delle TEA si va infatti ad introdurre modifiche mirate, senza riorganizzare l'assetto genetico della pianta e **preservando quindi le caratteristiche peculiari che contraddistinguono ciascuna varietà**. Questo significa che le nuove varietà si discosteranno dall'originale per modificazioni fenotipiche minime, o addirittura nulle, ascrivibili normalmente alla registrazione di un nuovo clone che mantiene lo stesso nome della varietà da cui derivano. Risulta quindi chiaro che **le piante ottenute con queste tecnologie potrebbero mantenere il loro appellativo originale** con la chiara conseguenza che risulterebbero automaticamente utilizzabili nei disciplinari delle varie denominazioni di origine (DOCG, DOC, IGT, ecc...), giovandosene, oltretutto sotto il profilo della sostenibilità.

Anche l'applicazione delle TEA presenta alcune difficoltà e fra questa va considerata la necessità di ottenere del tessuto molto particolare, noto come **callo embriogenico**, che in maniera simile alle cellule staminali degli animali, è in grado di ricreare una nuova pianta a partire da una o poche cellule.



Parliamo di difficoltà perché l'ottenimento di un buon quantitativo di callo embriogenico richiede un ingente lavoro da parte dei ricercatori: questo tipo di tessuto viene infatti ottenuto a partire da espianti specifici, ossia il filamento delle antere e gli ovari dei fiori. Ne consegue quindi che **la possibilità di raccogliere questo tipo di espianti è limitata** alla presenza di fiori di uno specifico genotipo di interesse, i quali devono essere in un particolare stadio di sviluppo, che è di solito limitato a 10-15 giorni all'anno. Inoltre, la capacità di questi espianti di generare callo embriogenico è ridotta, comportando la necessità di dover raccogliere migliaia di espianti per ottenere materiale sufficiente per i successivi processi.

## L'applicazione delle TEA in Italia

In tale contesto, l'Italia può vantare risultati di spicco a livello mondiale e il CREA, con il suo Centro di Viticoltura ed Enologia, può, dal canto suo, celebrare di aver raggiunto risultati di rilievo con lo sviluppo di protocolli specifici e uno sforzo massivo che hanno permesso di ottenere **callo embriogenico di varietà di interesse nazionale, come ad esempio Sangiovese e Glera, e internazionale, come Chardonnay e Pinot noir**. Inoltre, grazie allo sviluppo di un approccio simil-cisgenico (**BOX 1**) il CREA Viticoltura ed Enologia (CREA-VE) ha



trasformato e rigenerato questi genotipi, **ottenendo svariati cloni editati** che verranno valutati, in condizioni di laboratorio, durante l'anno 2023.

I cloni ottenuti sono stati editati per meglio tollerare gli stress connessi al cambiamento climatico e, in particolare, per la tolleranza ai patogeni (con particolare riferimento a peronospora e oidio) e allo stress idrico. Proprio su quest'ultimo punto, in seguito alla carenza idrica registrata in questi anni, il Centro ha anche sviluppato **alcune linee editate di portinnesto** (al momento sono disponibili cloni del genotipo 110 Richter e sono in fase di sviluppo cloni per il genotipo Kober 5BB) che possano fornire una piattaforma funzionale per quei genotipi che più difficilmente generano callo embriogenico e si adattano alle procedure per la trasformazione. In questo modo, grazie all'identificazione di geni che hanno una funzione sistemica, **le modifiche introdotte nel portinnesto saranno in grado di influenzare anche il nesto**, donandogli una maggiore tolleranza allo stress idrico.

Sul fronte dei risultati ottenuti in Italia, il CREA-VE può vantare di aver sviluppato, oltre alla tecnologia dell'editing, anche le metodiche necessarie all'applicazione della cisgenesi, ossia quel processo per cui geni presenti in specie sessualmente compatibili di vite vengono trasferiti in varietà di vinifera di elevato interesse. **Questo processo è assimilabile a quello che si otterrebbe con gli approcci di miglioramento genetico, ma evitando il riarrangiamento genomico e il trasferimento di sequenze non volute che spesso comportano un'influenza negativa sulle qualità organolettiche di uva e vino.** In particolare, il Centro, grazie alla collaborazione con l'Istituto di Genomica Applicata (IGA), ha potuto applicare le tecnologie sviluppate per trasferire un gene di resistenza alla peronospora (*Plasmopara viticola*) nelle varietà Chardonnay e Sangiovese. Le piante ottenute sono attualmente in fase di analisi e caratterizzazione per verificare se i caratteri trasferiti hanno migliorato la tolleranza al patogeno.



Infine, come ultimo risultato di rilievo ottenuto in Italia, sempre dal CREA, va ricordato **lo sviluppo di varietà di uva da tavola apirene**. Questo carattere, altamente apprezzato dai consumatori, è legato a una specifica modifica che causa l'aborto del seme e quindi un frutto privo di semi. Alcune delle varietà più ricercate per il loro profilo aromatico, come Italia e Victoria che non posseggono questo carattere si trovano a competere sul mercato con altre varietà, meno aromatiche, che risultano invece apirene e quindi apprezzate dai consumatori. **La possibilità di ottenere cloni di uva Italia e Victoria senza semi darebbe un nuovo impulso alla diffusione di queste varietà, favorendone la commercializzazione in Italia e nel mondo**. A tale scopo e grazie ad una collaborazione con l'Università degli Studi di Verona, il CREA ha iniziato a lavorare su questo obiettivo utilizzando la tecnologia dell'editing da protoplasto (**BOX 1**) e sta iniziando a valutare i risultati sui cloni rigenerati che ad oggi sono più di 200.

## Qual è lo stato di applicazione delle TEA in viticoltura nel mondo e in Italia?

Ad oggi, lo sviluppo di piante di vite in seguito ad applicazione delle TEA è per lo più limitato allo studio preliminare delle tecnologie per migliorarne lo sviluppo dei processi e per ottimizzare i protocolli. Dal punto di vista scientifico, i ricercatori italiani spiccano, insieme ai ricercatori cinesi, per la produzione di piante in cui è stato applicato l'editing genomico tramite l'inserimento in maniera stabile di un frammento di DNA nel genoma della pianta. **Questa metodica porta allo sviluppo di piante che vengono considerate organismi geneticamente modificati (OGM) in quanto la proteina deputata all'editing genomico viene inserita stabilmente nel genoma della pianta**. L'unica strategia per eliminare tale proteina sarebbe quella di intraprendere processi di incrocio, che riporterebbero, però, alla problematica dei tempi lunghi e a quella del cambio del nome della nuova varietà ottenuta.

## Ampliare gli orizzonti per preservare il patrimonio vitivinicolo nazionale

Dal punto di vista della ricerca di base, il primato per lo sviluppo di approcci utili all'applicazione delle nuove tecnologie per il miglioramento genetico della vite è conteso tra i ricercatori italiani e quelli cinesi. Tuttavia, **l'Italia risulta essere il paese più attivo dal punto di vista dello sfruttamento delle TEA per lo sviluppo di varietà migliorate di vite**, con un ruolo di preminenza del CREA che, insieme ad altri centri di ricerca e Università, sta portando avanti questo tema da diversi anni. Il lavoro fatto fino ad ora, e i cloni ottenuti, sono soltanto il primo passo verso uno sviluppo più ampio di queste tecnologie finalizzate ad aiutare la viticoltura italiana a **preservare quegli aspetti di tipicità e tradizione che la caratterizzano e la rendono unica nel panorama mondiale**. Per ottenere questo risultato sarà però necessario prevedere dei nuovi programmi di implementazione e la concomitante apertura dal punto di vista legislativo per la sperimentazione in campo. Il CREA si sta impegnando attivamente per proseguire le attività che sono state avviate e per completare la caratterizzazione di quelli che potrebbero essere i primi cloni di vite "TEA" a vedere la coltivazione in campo. Le piante migliorate già ottenute rimangono ad oggi confinate nell'ambiente laboratorio senza la possibilità di essere valutate in condizioni reali e senza, quindi, poterne dimostrare il reale valore e il potenziale a livello di sostenibilità.

La politica si è sensibilizzata su questo tema e ha iniziato ad occuparsene con la presentazione di un disegno di legge a firma dei Senatori Luca De Carlo, Raffaele Nevi e Gian Marco Centinaio che prevede proprio la possibilità di spostare la sperimentazione dei prodotti delle TEA in campo. Se questo fosse possibile, **nel giro di pochi anni i nuovi genotipi sarebbero disponibili al commercio e quindi utilizzabili nei vigneti riducendo**

la necessità di interventi umani, con conseguente diminuzione dell'impatto ambientale e la sua suscettibilità ai fenomeni climatici estremi, che negli ultimi anni si verificano con sempre maggiore frequenza.

## La strategia dei protoplasti

Proprio allo scopo di evitare questa problematica diversi gruppi italiani stanno lavorando allo sviluppo di una metodica che permette di ottenere **piante di vite editate senza l'inserimento di DNA estraneo nel genoma della pianta**. Questa tecnologia si basa sull'ottenimento di **protoplasti, cioè cellule che vengo private della parete, e del successivo inserimento in queste cellule delle proteine che permettono di ottenere l'evento di editing**. **Dopodiché si induce la rigenerazione delle piante che, derivando da cellule singole, saranno modificate in modo uniforme e non conterranno sequenze estranee**. Questo approccio, molto interessante per la possibilità di evitare l'inserimento di DNA esogeno è stato sviluppato e applicato da almeno 3 centri di ricerca/università nel contesto italiano, confermando che **su questo argomento il nostro Paese è all'avanguardia**. Fra i centri che hanno sviluppato la tecnologia dell'editing da protoplasto, il CNR – Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante di Torino (CNR – IPSP) ha attivamente collaborato con il CREA durante il progetto BIOTECH – VITECH per l'ottimizzazione dei protocolli, **riuscendo ad ottenere l'editing da protoplasto di due importanti varietà, il Nebbiolo e il Brachetto**. Le piante ottenute sono attualmente in fase di studio presso i laboratori del CNR – IPSP in attesa della possibilità di valutare le loro caratteristiche in ambiente reale.

## La strategia simil-cisgenica

Alternativamente a questo approccio, che richiede la generazione di tessuti specifici e con efficienze che ad oggi sono abbastanza limitate, si può utilizzare la strategia simil-cisgenica, ovvero l'introduzione del DNA che porta l'informazione per la proteina Cas e per le sequenze che guidano la Cas sul genoma delle vite dove compirà l'editing e **la successiva eliminazione di queste sequenze, una volta avvenuto l'editing**. Con questa metodologia sarebbe quindi possibile editare le piante senza passare dai protoplasti ed evitando la produzione di piante OGM. Su questo fronte l'Italia, e il CREA nello specifico, ha sviluppato le tecnologie che sono già state applicate con risultati sorprendenti. **Sono infatti attualmente in fase di valutazione diverse decine di cloni ottenuti da editing di varietà di interesse (Chardonnay, Pinot noir, Glera, Sangiovese e 110 Richter)** che, non appena sarà possibile, verranno valutati in condizioni di campo sperimentale.



# Olivo: la scommessa sulle varietà “migliori”

Di Zelasco / Perri / Viggiani



Negli ultimi anni a causa degli effetti del cambiamento climatico e dell’insorgere sempre più frequente di nuove emergenze fitosanitarie, si sta assistendo a una vera e propria rivoluzione nella gestione dell’oliveto. Il mondo della ricerca è impegnato in tecniche innovative che consentano di ottenere nuove varietà in olivo, ‘migliori’ in tempi più brevi. Le TEA sono la risposta, in quanto trasferiscono un singolo carattere in modo puntuale, senza alterare il patrimonio genetico della varietà, che manterrebbe, invece, tutti i suoi tratti caratterizzanti

**Il contesto** L’olivo rappresenta la specie arborea da frutto più antica del Bacino Mediterraneo ma, paradossalmente, è la meno conosciuta e studiata [\[CG\(U1\)\]](#). Fino a non molto tempo fa, era opinione comune pensare all’olivo come ad una pianta con poche esigenze, sia in termini di input produttivi (ad es., senza esigenze di irrigazione), che colturali. Non a caso l’olivo è, tuttora, una delle colture arboree che si presta maggiormente all’applicazione dei principi dell’agricoltura biologica. Tuttavia, negli ultimi anni, si sta assistendo a una vera e propria rivoluzione nella gestione dell’oliveto.

**Il cambiamento climatico in corso sta impattando fortemente sulla produttività e sulla qualità della nostra olivicoltura.** L’incremento della temperatura media sta condizionando la qualità dell’olio, determinando una riduzione della percentuale di acido oleico in paesi con clima già di per sé molto caldi, come, ad esempio, Israele. Una situazione drammatica si registra in Andalusia (la regione della Spagna ove si concentra la maggior parte della produzione olivicola mondiale), che sta incontrando enormi difficoltà nel far fronte alle problematiche relative alla siccità. Stiamo assistendo all’emergenza dovuta a problematiche fitosanitarie mai riscontrate prima, come la *Xylella fastidiosa* nel Salento, l’aggravarsi dell’incidenza di attacchi da parte di insetti e patogeni che in passato venivano considerati di secondaria importanza. A tutto questo, si aggiungo-

no problemi legati a difetti dell'impollinazione a causa dell'anomalia dell'andamento climatico, che contribuiscono ad abbattere la produttività degli oliveti.



Il mondo della ricerca ha allargato, pertanto, il proprio orientamento, includendo studi finalizzati all'individuazione di strategie e soluzioni per far fronte a questo drammatico scenario. L'olivicoltura italiana è caratterizzata da una struttura produttiva molto diversa da quella di altri paesi grandi produttori di olio di oliva come, ad esempio, la Spagna, e si contraddistingue per un numero elevato di varietà autoctone che mostrano un forte legame con il territorio e che hanno permesso il riconoscimento del marchio di qualità IGP e DOP. Spesso si tratta di varietà molto antiche, che non sempre mostrano caratteri di rusticità e di spiccata qualità dell'olio. La realtà produttiva italiana lascia poco spazio al processo di innovazione varietale, anche se il cambiamento climatico in corso sta determinando un graduale incremento della diffusione della coltivazione dell'olivo negli areali più interni e settentrionali della penisola.

**Il miglioramento genetico in olivo** rappresenta uno degli strumenti per far fronte alle problematiche descritte. Tuttavia, **i programmi di breeding in Italia e nel mondo non hanno mai avuto un grande successo e le nuove varietà ottenute, rispetto all'enorme sforzo e durata del programma stesso, sono state veramente poche.** I primi programmi di breeding sono iniziati in Israele ed in Italia tra il 1960 ed il 1971. Recentemente, i risultati di maggiore rilievo sono stati ottenuti dall'Università di Bari, con la varietà Lecciana (figlia di Leccino ed Arbosana), e dall'università di Cordoba, con la varietà Chiquititas o Sikitita (figlia di Picual e Arbequina), ottenuta in un programma di miglioramento genetico iniziato nel 1991. Altre varietà caratterizzate da una certa diffusione sono la Giulia, la Don carlo e la FS17 o Favolosa, ottenute dal CNR di Perugia, sempre nell'ambito di un programma di breeding iniziato ben oltre 30 anni fa. Tutte queste varietà sono indicate come idonee ad impianti ad altissima densità, comunemente definiti superintensivi, e sono brevettate.

**L'olivo è una specie difficile da studiare, a causa di una serie di caratteristiche intrinseche della sua biologia che rallentano enormemente il lavoro del breeder.** Ad esempio, quando si effettua un incrocio, i



caratteri dei parentali trasmessi alla progenie talora non segregano – ovvero vengono ‘nascosti’ – e non sono sempre valutabili. Inoltre, le progenie spesso impiegano molti anni per entrare in produzione, anche se protocolli di forzatura in serra ed in campo consentono ora di avere il 15-30% delle progenie a fiore nell’arco di due o tre anni, accelerando così l’entrata in produzione e la valutazione di tratti di grande interesse, come la produttività e la qualità dell’olio. Ad ogni modo, le risorse umane ed economiche richieste per avviare programmi di breeding efficienti in olivo sono davvero molto elevate.



## Le TEA in olivo

Per queste ragioni, diventa ancor più fondamentale l’adozione di tecniche innovative in olivo che consentano di ottenere una nuova varietà, “*migliore*” in tempi più brevi. Le TEA consentono tutto questo, oltre alla possibilità – non di minore importanza- di trasferire un singolo carattere in modo puntuale, senza alterare il patrimonio genetico della varietà, che manterrebbe, invece, tutti i suoi tratti caratterizzanti. Tuttavia, due condizioni fondamentali sono richieste per poter realizzare un approccio innovativo basato sulle TEA:

- **la rigenerazione *in vitro* della varietà che consente di ottenere una pianta intera da porzioni di tessuto somatico quali foglie, piccioli, radici, etc., e che permette di ottenere piante ‘edite’;**
- **la conoscenza dei geni e, ancor meglio, delle mutazioni (piccole modifiche del DNA) all’interno dei geni, che sono le reali responsabili del miglioramento di quel dato carattere.**

Inoltre, occorre conoscere tutti i tratti tipici della varietà che si intende migliorare per poter stabilire su quale tratto occorra intervenire e questo presuppone una caratterizzazione del fenotipo o fenotipizzazione (ovvero la valutazione dell’espressione di tutti i caratteri della varietà) molto approfondita e completa. Per quanto riguarda il primo aspetto, l’olivo è considerato generalmente una specie recalcitrante e gli esempi di successo sono ad oggi davvero limitati, anche se, negli ultimi anni, alcuni progressi sono stati fatti. Sfortunatamente, i gruppi di ricerca nel mondo che svolgono attività biotecnologica in olivo sono pochissimi. **Il primo ed unico caso di rigenerazione in olivo da tessuto adulto è stato, per molti anni, quello della cv Canino e della cv Moraiole, ottenute dal Prof. Rugini, dell’Università della Tuscia di Viterbo, mediante il metodo della doppia rigenerazione.** Attraverso questo metodo è stato possibile ottenere piante transgeniche di Canino tolleranti lo stress idrico e con architettura vegetativa modificata. Solo recentemente è stata ottenuta la rigenerazione delle varietà Dahbia e Picual da gruppi di ricerca internazionali, rispettivamente tunisini e spagnoli. Alcuni



genotipi selvatici di olivo sono stati anche rigenerati con tratti di tolleranza ("StopVert", "OutVert", "Ac-18") e di suscettibilità ("Ac-15") a *Verticillium dahliae*.

Per quanto riguarda il secondo aspetto, **numerosi sono i lavori in olivo di questi ultimi anni che hanno individuato i geni responsabili di un particolare tratto e/o processo biologico in olivo (geni chiave in risposta a patogeni, per la composizione chimica dell'olio, per l'architettura vegetativa, etc.) Tuttavia, ad oggi, le mutazioni entro questi geni – le vere responsabili della codifica del carattere – non sono ancora state individuate.**



## Come si posiziona il CREA in questo contesto

Le attività di ricerca del CREA, con il suo Centro di ricerca Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA), in relazione al miglioramento genetico in olivo hanno radici lontane che affondano fino al 1971, quando il Prof. Bellini dell'Università di Firenze avvia uno dei primi programmi di breeding in olivo, in collaborazione con l'allora Istituto sperimentale per l'olivicultura (oggi CREA OFA), che ha portato alla selezione di tre nuove varietà: Arno, Tevere e Basento. Il Centro ha registrato nel 2017 due nuove varietà a duplice attitudine: la 'Rossa di Sicilia' e la 'Dolce di Sicilia' (derivanti da due incroci: Tonda Dolce di Partanna x Nocellara del Belice/ Nocellara messinese x Buscionetto) derivate da un programma di breeding iniziato nel 1991.

Recentemente, grazie alla intensa attività del CREA-OFA di caratterizzazione della collezione di riferimento nazionale di Mirto Crosia [\[CG\(U2\)\]](#), nell'ambito di diversi progetti nazionali ed internazionali (programma RGV-FAO, progetto Gen4olive, progetto Genolics), sono stati studiati a fondo i caratteri bioagronomici quali vigoria, epoca di fioritura e maturazione, produttività, qualità e resa in olio, tolleranza agli stress biotici e abiotici, resistenza al distacco, di più di 150 varietà italiane. Si è trattato di una intensa attività di 'fenotipizzazione' che ha portato alla selezione di una decina di parentali (varietà superiori per alcuni tratti di interesse, selezionate come genitori da incrociare tra loro), altra varietà con tratti ben definiti e stabili nel tempo, aspetti fondamentali per garantire il successo di un programma di miglioramento genetico. Il programma di breeding del CREA-OFA ha una connotazione tutta italiana perché include l'impiego di risorse genetiche esclusivamente nazionali, valorizzando l'incredibile patrimonio di biodiversità del nostro germoplasma olivicolo.

**Il sequenziamento del genoma di Leccino, recentemente ottenuto dal CREA-OFA, contribuirà ad accelerare il processo di individuazione di nuovi geni di interesse e rappresenta un ottimo genoma di riferimento anche per l'individuazione delle mutazioni responsabili di tratti agronomici superiori.**

Nell'ambito del progetto Genolics (sottoprogetto di Biotech) il CREA-OFA, supportato dalla esperienza del prof. Rugini e del suo gruppo di ricerca, ha avviato una **intensa attività di ricerca sull'ottimizzazione dei protocolli di rigenerazione in olivo e ha ricercato i geni candidati e le mutazioni responsabili della qualità e della resa in olio.**



## Cosa ha fatto finora il CREA e cosa si intende fare

L'intensa attività di 'fenotipizzazione' della collezione del CREA-OFA ha consentito, oltre a selezionare i parentali più pregevoli, anche di individuare quali tratti di interesse debbano essere inseriti in varietà note che potrebbero essere migliorate tramite TEA. Ad esempio, la varietà calabrese 'Carolea' presenta come principale difetto la suscettibilità a *Spilocaea oleagina* (responsabile dell'occhio di pavone); così come la 'Tondina', altra importante varietà calabrese, – presenta una certa suscettibilità a *Pseudomonas sevastanoi* ("rogna"). La varietà Racioppella campana, invece, potrebbe essere idonea ad impianti più razionali ed intensivi, ma occorrerebbe migliorarne la qualità dell'olio corrispondente.

Il CREA-OFA ha poi individuato, nell'ambito del progetto Genolics, **alcune potenziali mutazioni responsabili dell'elevato contenuto di acido oleico, acido linolenico, idrossitiroso (composto fenolico a valenza nutraceutica) e della resa in olio.** Ad oggi, queste mutazioni sono in corso di validazione. La conoscenza a priori della mutazione responsabile del miglioramento di un dato carattere non può che rendere più efficiente il sistema di editing.

In ultimo, il Centro, supportato dal gruppo di ricerca della Tuscia, ha messo a punto **un protocollo di rigenerazione stabile per almeno un genotipo di olivo (CS3T) e ha allestito *in vitro* numerose varietà note per indurre il ringiovanimento della coltura,** aspetto chiave per migliorare l'efficienza di rigenerazione in olivo.

In prospettiva, i ricercatori stanno già lavorando in diversi progetti per l'individuazione di nuovi geni e mutazioni responsabili di tolleranze/resistenze a stress biotici e abiotici. In particolare, gli obiettivi per il genome editing riguardano la **possibilità di inserire mutazioni responsabili della resistenza genetica in olivo allo stress idrico e a *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas sevastanoi*, *Verticillium dhaliae* e *Spilocaea oleagina*.**

## Coltura dell'olivo: cenni storici, andamento della produzione e criticità del comparto

**La storia** L'albero d'olivo e l'olio che si ricava dai suoi frutti hanno accompagnato la storia dell'umanità. Le origini di questa pianta così preziosa, da sempre simbolo di pace e prosperità, si confondono tra storia, leggenda e mitologia.

Le prime coltivazioni di ulivo risalgono a circa 8000 anni fa e sono state rinvenute in Asia minore nel territorio compreso tra il sud del Caucaso, gli altopiani dell'Iran e le coste mediterranee della Siria e della Palestina.

Successivamente, la coltura si estese all'Egitto prima e ai Fenici poi, che contribuirono a diffonderla lungo le coste mediterranee dell'Africa e del Sud Europa, soprattutto in Grecia dove divenne un simbolo, dono di Atena agli uomini. E furono proprio i Greci a propagare le coltivazioni di ulivo in tutte le terre della Magna Grecia, introducendole in Italia verso la metà del primo millennio a.C. I Romani le portarono in ogni territorio conquistato e furono i primi ad esercitare le pratiche di potatura e di concimazione più efficaci, a costruire strumenti per la spremitura delle olive e a perfezionare le tecniche di conservazione dell'olio. Con il crollo dell'Impero Romano, in seguito alle invasioni barbariche, la pratica colturale dell'ulivo quasi scomparve e riuscì a sopravvivere prevalentemente nei monasteri per poi riprendersi nell'età Rinascimentale. Nel XIX secolo lo Stato della Chiesa con Pio IX garantì un premio in denaro per ogni ulivo piantato e curato per 18 mesi e, successivamente, Re Umberto emanò un decreto con il quale vietava l'abbattimento degli ulivi su tutto il suolo italiano.

**Lo stato del settore** In questi ultimi anni l'olivicultura italiana si è trovata ad affrontare la devastante epidemia della Xylella fastidiosa e la crescente concorrenza dei Paesi mediterranei. Tuttavia, il settore olivicolo italiano è tra i più importanti al mondo: la nostra produzione incide per il 15-18% su quella globale (al secondo posto, dopo la Spagna), siamo il secondo esportatore e il primo importatore poiché le nostre produzioni non sono sufficienti al fabbisogno interno di primo consumatore mondiale. L'olio, infatti, è il condimento principe della dieta mediterranea e della cucina italiana. Abbiamo **1 milione di ettari di superficie olivetata, gestiti da 827mila aziende agricole**, la gran parte localizzate in Puglia, Calabria e Sicilia, anche se in diverse regioni italiane, come Lazio e Umbria, la produzione olivicola raggiunge livelli qualitativi eccellenti. Purtroppo, però, **siamo in forte ritardo** rispetto alla concorrenza di altri Paesi, che hanno aggiornato gli impianti ed ampliato la produzione, anche mediante la realizzazione di nuovi oliveti.

**Punti di forza e principali criticità** I punti di forza della nostra olivicultura sono rappresentati dall'alto livello qualitativo degli oli prodotti e dall'elevata eterogeneità territoriale, con la conseguente diffusione di un grande numero di varietà (oltre 500 cultivar). Questi fattori hanno determinato una forte differenziazione territoriale della produzione, che ha portato a 42 oli DOP e 7 IGP, intimamente legati al loro territorio di provenienza, ma sempre ascrivibili all'eccellenza del made in Italy. Tuttavia, i nuovi impianti ad alta o altissima densità, in filare o in parete, vengono proposti impiegando varietà di olivo a diffusione internazionale, poco riconoscibili sul mercato.

Le difficoltà dell'olivicultura italiana sono molteplici. Si va dall'elevata polverizzazione delle proprietà (il 63% è costituito da piccole e medie imprese, per lo più a conduzione familiare) alla collocazione in ambienti collinari di una larga parte degli oliveti, fino alla predominanza degli oliveti tradizionali, circa i 3/4 del totale, che, in generale, possono essere meno produttivi e limitanti nell'uso delle macchine, sebbene svolgano spesso funzioni ambientali, paesaggistiche, storiche e monumentali, difficilmente realizzabili con nuovi impianti. Attualmente, le criticità maggiori riguardano il rapporto qualità/prezzo e la competitività internazionale che interessa meno del 40% delle aziende.



## Mirto Crosia

La collezione di germoplasma olivicolo di **Mirto Crosia**, realizzata e curata dal CREA-OFA, **è una delle collezioni di olivo più grandi al mondo**, insieme ai banche di germoplasma spagnolo, del Marocco della Turchia, e rappresenta la collezione di riferimento italiana per il Consiglio Oleicolo Internazionale (COI). **La raccolta include 405 varietà italiane e 53 straniere oltre a circa 100 accessioni**. Nell'ambito del programma RGV-FAO la collezione si sta arricchendo di nuove varietà nazionali, internazionali e di accessioni selvatiche.

**L'importanza di una grande collezione deriva dalla possibilità di studiare, in condizioni ambientali uniformi, il comportamento agronomico delle varietà che possono esprimere il proprio potenziale genetico senza condizionamenti ambientali.**

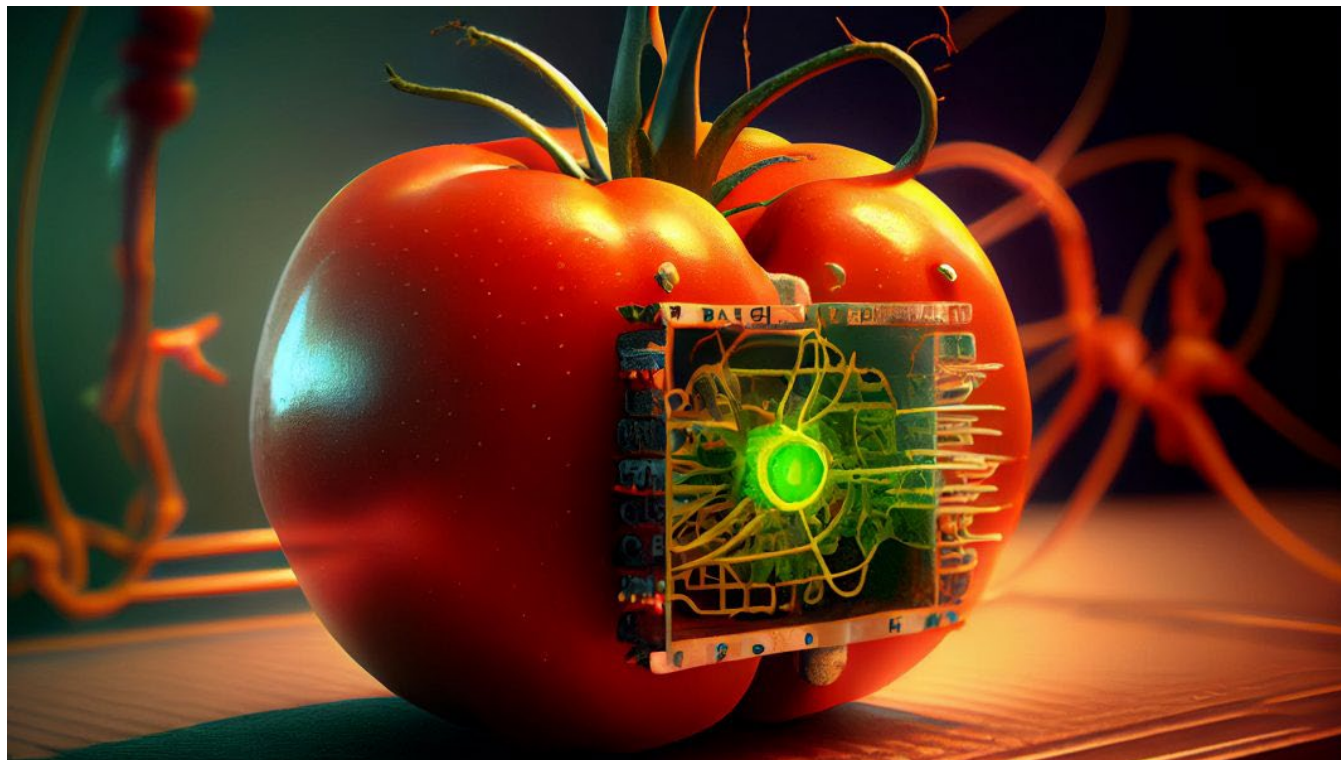
**Il confronto varietale consente di selezionare varietà e/o parentali che sono geneticamente superiori, attraverso una fenotipizzazione condotta per molti anni.**

L'acquisizione di dati fenotipici su scala più che ventennale ha consentito di produrre una banca dati utile per lo sviluppo di modelli previsionali e per valutazioni del comportamento varietale in relazione all'impatto del cambiamento climatico.

La collezione di Mirto Crosia preserva buona parte della biodiversità olivicola italiana ed internazionale ed è un laboratorio a cielo aperto di importanza cruciale per tutte le attività di ricerca presenti e future del CREA.

# Pomodoro: il futuro è già qui

Di D'Orso / Nicolia / Sestili



Come saranno i pomodori che mangeremo nei prossimi anni? Il loro miglioramento genetico potrebbe essere decisivo per rispondere alla sfide poste da produttività, qualità e sostenibilità (es. riduzione utilizzo acqua, fertilizzanti e fitofarmaci).

Lo sa bene il CREA che, da un lato, presso il suo Centro Orticoltura e Florovivaiismo, con il progetto BIOTECH-CISGET si propone di produrre nuove varietà di pomodori resistenti ai patogeni e di migliorare la loro qualità organolettica e nutrizionale; dall'altro, invece, presso il suo Centro di Genomica e Bioinformatica, grazie al contributo del progetto SMART-BREED, si concentra maggiormente sul breeding di varietà resilienti, che mantengano le caratteristiche produttive e di tipicità in condizioni ambientali variabili ed estreme.

Le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) rappresentano un vero punto di svolta in quanto consentono di introdurre piccoli e mirati cambiamenti genetici in modo preciso, generando nuovi prodotti vegetali con proprietà sorprendentemente innovative.

In questo scenario, **il pomodoro è protagonista assoluto, in quanto modello per studiare caratteri importanti associati allo sviluppo della pianta, alla fioritura, allo sviluppo dei frutti e alla maturazione:** in particolare il pomodoro è da sempre uno dei soggetti favoriti per il miglioramento del contenuto in sostanze di interesse salutistico, grazie al suo ampio impiego come prodotto sia fresco che trasformato.

**L'Italia è il primo produttore europeo di pomodoro** con 6.6 milioni di tonnellate e oltre 6000 milioni di euro di fatturato. (FAO Stat 2021).

**A livello internazionale le TEA** sono oramai molto diffuse e sono già state utilizzate in pomodoro per l'ottenimento di genotipi: a) **resistenti a malattie virali** come il *Tomato yellow leaf curl virus*, il *Tomato Mosaic Virus*, il *Cucumber Mosaic virus* e il *Potato Virus Y*; b) **resistenti a malattie batteriche** come il **cancro batterico** (*Pseudomonas syringae*); c) **resistenti a malattie fungine** come l'**oidio o mal bianco del pomodoro** (*Oidium lycopersici*), la **peronospora** (*Phytophthora infestans*) e la **botrite** (*Botrytis cinerea*); d) **resistenti alla carenza di acqua, all'eccessivo calore, al freddo e alla salinità**; e) **con differente contenuto in molecole antiossidanti (es. carotenoidi), vitamine (provitamina A) e aroma**; f) **con differenti caratteristiche agronomiche (es. architettura della pianta, fioritura, numero e forma dei frutti, assenza di semi nel frutto)**.

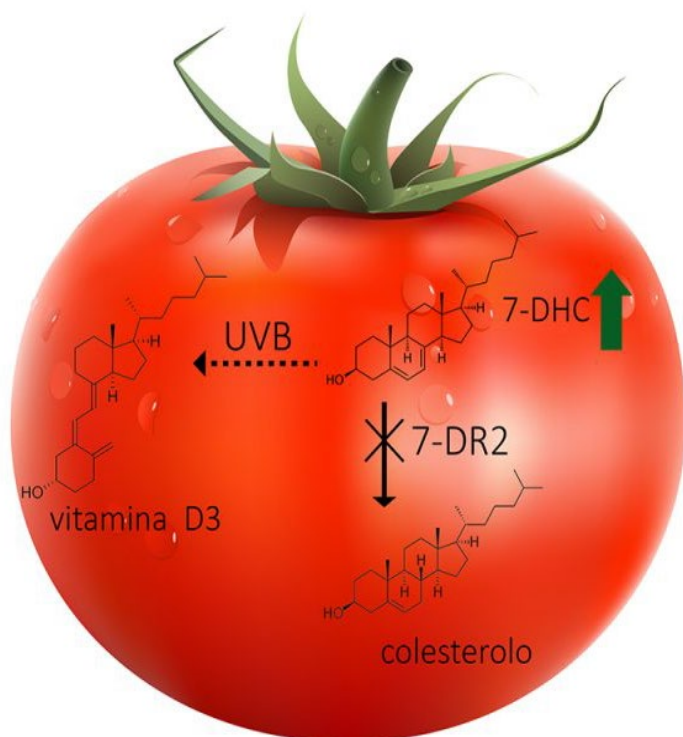
Ha certamente suscitato molto clamore il recente caso del pomodoro arricchito in un aminoacido utile per abbassare la pressione sanguigna, l'acido gamma amino-butirrico (GABA): il pomodoro è stato chiamato "*Sicilian Rouge High GABA*" ed è già commercializzato in Giappone, la cui legislazione considera le piante prodotte con le TEA al pari di quelle ottenute mediante sistemi convenzionali.

## La ricerca CREA: i progetti BIOTECH-CISGET e SMART-BREED

In questo scenario di grande fermento scientifico rispetto al miglioramento genetico del pomodoro basato sull'utilizzo delle TEA, il CREA si colloca da protagonista. Il progetto BIOTECH-CISGET (*Bioteχνologie sostenibili per l'agricoltura italiana – Cisgenesi e genome editing in pomodoro*), finanziato dal MASAF e conclusosi con successo a febbraio 2023, ha permesso ai ricercatori di mettere a frutto le conoscenze acquisite sulle TEA per produrre **genotipi di pomodoro: a) resistenti all'attacco delle piante parassite; b) resistenti alla salinità** (collaborazione CNR-IBBR Portici); **c) resistenti alla siccità** (collaborazione Università di Milano); **d) con un più elevato contenuto di Vitamina C** (collaborazione Università di Napoli Federico II, Dipartimento di Agraria) **e con la capacità di produrre provitamina D nei frutti** (collaborazione con John Innes Centre Norwich –

Regno Unito e CNR-ISPA Sede di Lecce); **e) con alterata maturazione; f) con più elevato contenuto zuccherino nei frutti; g) con migliore efficienza di utilizzo della luce** (collaborazione Università di Verona – Dipartimento di Biotecnologie).

**Fig. 1** – Schema della via biosintetica che, modificata tramite le TEA, porta all'accumulo di provitamina D3 (7-DHC) nei frutti di pomodoro. Foto di Fabio D'Orso (CREA-GB)



In particolare, **presso il CREA Orticoltura e Florovivaismo (CREA-OF)**, sono stati prodotti **genotipi di pomodoro resistenti all'attacco delle piante parassite, un problema in grande aumento nell'area Mediterranea ed in forte diffusione in Europa. Le modifiche genetiche ottenute tramite le TEA hanno riguardato i geni coinvolti nella biosintesi e nel rilascio, da parte delle radici delle piante, di specifiche sostanze chimiche – chiamate strigolattoni – che inducono la**

**germinazione dei semi delle piante parassite nel terreno. Il prossimo passo sarà quello di testare queste piante come portainnesti in specie di pomodoro di interesse commerciale.**



Sempre presso il CREA-OF sono stati prodotti genotipi a più alto contenuto zuccherino o grado brix ( $^{\circ}$ Brix). L'ottenimento di varietà di pomodoro, destinate al mercato fresco e all'industria, aventi un elevato  $^{\circ}$ Brix, rappresenta un obiettivo fondamentale sia dal punto di vista economico – in quanto aumenta il valore commerciale del prodotto – sia qualitativo, in quanto un elevato  $^{\circ}$ Brix è anche espressione di un alto contenuto in sostanze aromatiche, una migliore quantità di vitamine e una maggiore *shelf-life* del prodotto. **Con le TEA, in questo caso, è stata introdotta una mutazione che determina l'aumento di glucosio e fruttosio ( $^{\circ}$ Brix) nei frutti.** La disponibilità di piante di pomodoro aventi un alto  $^{\circ}$ Brix, rappresenta un importante punto di partenza per attività future finalizzate al miglioramento della qualità legata al metabolismo degli zuccheri e alla valorizzazione del germoplasma del pomodoro.

Pianta non editata



Pianta editata con le TEA



**Fig. 2** – Radici di pomodoro infettate con semi della pianta parassita orobanche. La formazione dei tubercoli dovuti all'infezione (cerchi verdi) nella pianta non editata è più elevata rispetto alla pianta editata con le TEA. Foto di Alessandro Nicolìa (CREA-OF)



**Fig. 3** – Ottenimento dei pomodori a più alto  $^{\circ}$ Brix tramite le TEA, dalla rigenerazione in vitro alla raccolta del prodotto. Foto di Sara Sestili (CREA-OF)

Presso il CREA Genomica e Bioinformatica (CREA-GB), invece, la ricerca si è, invece concentrata maggiormente sugli aspetti qualitativi, anche grazie al contributo del progetto SMART-BREED (*Tecnologie molecolari innovative per l'adattamento delle specie ortive al cambiamento climatico mediante breeding di precisione*), finanziato dalla Regione Lazio (POR FESR Lazio 2014-2020).

Le attività di ricerca sono focalizzate sullo studio di geni coinvolti nella biosintesi di un importante **ormone, l'etilene**, che regola la maturazione della bacca di pomodoro, un processo normalmente molto veloce che porta il frutto ad un rapido ammorbidimento della polpa (*softening*) con conseguente deperimento della bacca e aumentata suscettibilità a microrganismi saprofiti. **Attraverso l'utilizzo delle TEA, si sta tentando di**

**diminuire i livelli endogeni di questo ormone al fine di rallentare, ma non di bloccare il processo di maturazione. Questa modifica consentirà in futuro di aumentare la conservabilità dei frutti raccolti.**

Sempre presso il CREA- GB, nell'ambito di collaborazioni internazionali, si sta lavorando allo studio di importanti vie metaboliche che portano alla produzione di molecole con proprietà salutistiche, come acido clorogenico, flavonoidi e alcaloidi steroidei. In particolare, in questo ambito è stata generata **una linea di pomodoro in grado di far fronte alla carenza di vitamina D, una novità assoluta dal punto di vista nutrizionale e biotecnologico**. Lo studio, pubblicato sulla prestigiosa rivista scientifica *Nature Plants*, dimostra come sia stato possibile, mediante le TEA, modificare in modo estremamente preciso il gene di pomodoro coinvolto nella biosintesi della provitamina D3 ovvero il precursore della Vitamina D assumibile con la dieta. In questo modo con una porzione da 200 g di pomodori così biofortificati si apporterebbero 2,4 microgrammi di vitamina D3, una valida fonte di questo importante nutriente, al pari delle uova o della carne.

#CREABREAK per #innovazione2020: il #miglioramentogenetico di #OrticulturaFlorovivaismo

<https://www.youtube.com/watch?v=XFIRQkEgX8s>

# Melanzana: senza semi, prima di tutto

Di Rotino / Toppino / Tassone



La melanzana è un tipico ortaggio mediterraneo, presente in numerose varianti nella tradizione culinaria italiana. I principali obiettivi del suo miglioramento genetico sono la maggiore resistenza a stress biotici (insetti, funghi e batteri) e abiotici, come le temperature elevate, le carenze idriche o gli eventi estremi legati ai cambiamenti climatici. Il CREA Genomica e Bioinformatica, con il progetto BIOTECH-QUALIMEC (Biotecnologie sostenibili per l'agricoltura italiana – Miglioramento delle proprietà qualitative in melanzana e carciofo mediante approcci di genome editing e cisgenesi), è impegnato in linee di melanzana con frutti privi di semi, andando incontro alle esigenze del consumatore

La melanzana (*Solanum melongena*) è una specie appartenente al sottogruppo "spinoso" delle Solanacee, una delle più grandi famiglie botaniche esistenti, che comprende centinaia di specie, tra cui anche altre illustri orticole come il pomodoro, la patata e il peperone.

Originaria del Vecchio mondo, è stata importata in Europa durante le colonizzazioni dei Mori e attualmente è coltivata nelle aree temperate e temperato-calde di tutte le latitudini, con la Cina al primo posto nella produzione mondiale e l'Italia in quella europea.

La ricchezza in vitamine, il basso contenuto calorico e la forte presenza di sostanze ad alto valore nutraceutico, ne fanno uno degli alimenti indispensabili di una dieta sana ed equilibrata, ed una importante protagonista delle tradizioni culinarie di molti Paesi.



Di questa coltura orticola, tipicamente mediterranea, esistono numerose varietà locali differenti per colore, forma e dimensione della bacca e per l'attinenza alle tipiche preparazioni culinarie. La produzione avviene durante tutti i periodi dell'anno, grazie alle coltivazioni extra-stagionali in serra.



**Fig. 1** – Calli con germogli editati selezionati in vitro; (b) vista della cella di coltura in vitro con espianti in rigenerazione e piante radicate; (c) pianta editata sottoposta ad autofecondazione; (d) pianta editata con 2 frutti ottenuti da fiori emasculati; (e, f) fiori di piante editate che mostrano un precoce accrescimento dell'ovario evidenziato dalla contemporanea presenza di petali o stilo ancora vitali; (g, h) frutto maturo di dimensione commerciale intero e tagliato che non presenta alcun seme ottenuto da pianta editata. Foto di Giuseppe Leonardo Rotino e Laura Toppino

**Il principale obiettivo del suo miglioramento genetico è la maggiore resistenza della pianta sia a stress biotici (insetti, funghi e batteri) sia a quelli abiotici (le temperature elevate, le carenze idriche o gli eventi estremi legati ai cambiamenti climatici), che possono incidere notevolmente sulla qualità e la resa delle coltivazioni. Per quanto riguarda poi i frutti, tra i principali scopi del miglioramento possono essere annoverati: un più elevato contenuto in composti di interesse nutraceutico e un limitato apporto di sostanze anti-nutrizionali, la varietà di colore e la lucentezza della buccia, il colore della polpa, la consistenza più spiccata e un ridotto imbrunimento, ma, è soprattutto, l'assenza di semi, la caratteristica maggiormente richiesta anche dalle industrie di trasformazione (prodotti surgelati) e conservazione.**

Nel mondo, molti gruppi di ricerca stanno utilizzando le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) in melanzana, orientando l'attenzione sugli aspetti economici e principalmente sul miglioramento della qualità della bacca o sulla resistenza a patogeni. In Italia, il primo esempio di utilizzo delle TEA in melanzana ha riguardato alcuni geni delle polifenolossidasi (PPO), con l'obiettivo di ridurre l'imbrunimento della polpa.



Rispetto alle altre solanacee da frutto (pomodoro e peperone), in melanzana la maturazione commerciale è sempre largamente anticipata rispetto alla maturazione fisiologica, poiché quest'ultima – che grossolanamente si può far coincidere con la presenza di ingiallimenti della buccia e semi – deprezza notevolmente il prodotto, fino a renderlo non più commercializzabile. La presenza dei semi non è infatti molto apprezzata dal consumatore poiché fa ammorbidire la polpa, rovinandone la struttura, tende a farla imbrunire più velocemente e sembra renderla più piccante. La partenocarpia, ossia la capacità delle piante di produrre frutti senza la necessità di impollinazione, è un tratto molto vantaggioso e un importante oggetto dell'attività di miglioramento genetico in melanzana: **essa consente di produrre frutti privi di semi, di estendere il periodo di raccolta delle bacche e anche di avere produzioni in condizioni ambientali sfavorevoli all'impollinazione, come nelle coltivazioni in serra, con notevole riduzione dei costi di riscaldamento e manodopera, senza dimenticare una migliore performance sotto il profilo della sostenibilità, in quanto possono essere evitati i trattamenti con sostanze chimiche alleganti.**



## La ricerca CREA: il progetto BIOTECH-QUALIMEC

Il CREA Genomica e Bionformatica, nell'ambito del progetto BIOTECH-QUALIMEC (Biotecnologie sostenibili per l'agricoltura italiana – Miglioramento delle proprietà qualitative in melanzana e carciofo mediante approcci di genome editing e cisgenesi), finanziato dal MASAF, si è inserito all'interno di questo contesto con l'obiettivo di ottenere linee di melanzana senza semi, attraverso lo sviluppo partenocarpico del frutto.

Come tanti altri frutti, anche quello della melanzana si origina dall'ingrossamento dell'ovario. Lo sviluppo del frutto è un processo estremamente regolato da numerosi fattori ed è ormai noto che l'aumento dei livelli di alcuni ormoni – e soprattutto dell'auxina – giocano un ruolo fondamentale nell'attivazione di questo processo. Nel fiore aperto l'ovario è già formato, ma si trova in uno stato "quiescente" e la sua crescita è bloccata da alcuni geni regolatori negativi che impediscono alle auxine di far ingrossare il frutto. Questo impedimento rimane forte fino a che non avviene l'impollinazione: una volta che gli ovuli vengono fecondati e si è formato l'embrione, si attivano dei segnali che arrestano l'attività dei geni regolatori negativi, liberando le auxine nell'ovario e quindi determinando lo sviluppo del frutto.

In collaborazione con i Dipartimenti di Biotecnologie dell'Università di Verona e di Bioscienze dell'Università di Milano (Dbs-Unimi), si è agito, mediante l'utilizzo delle TEA, su alcuni di questi geni coinvolti nei meccanismi di sintesi e regolazione dei livelli di auxine dell'ovario. **Sono state generate linee di melanzana con sviluppo del frutto partenocarpico e quindi senza semi. E' interessante notare che, in alcune di queste linee, l'effetto partenocarpico non è stato completo e si sono ottenuti frutti con pochi semi.** Si tratta di un aspetto comunque interessante dal punto di vista commerciale, in quanto, al tempo stesso, permette di poter continuare a propagare sessualmente queste linee.



# Giù le mani dal Pesto: il caso del Basilico Genovese Dop

Di Laura / Savona



Il basilico è una specie orticola molto coltivata in Italia e soprattutto in Liguria. È una coltura di interesse per il consumo fresco e, dalla sua trasformazione, si ottiene la salsa cruda più venduta al mondo, ossia il pesto, un'eccellenza del **Made in Italy**. Da tanti anni, tuttavia, le coltivazioni di basilico sono duramente compromesse dalla *Peronospora*, che provoca evidenti danni e morte della pianta intera.

Il CREA- Centro di Orticoltura e Florovivaismo, con il progetto BIOTECH-GEO (Biotecnologie sostenibili per l'agricoltura italiana – Genome Editing in *Ocimum*), finanziato dal MASAF, ha prodotto delle piante con una resistenza migliorata al parassita fungino, mantenendo il profilo aromatico e l'identità genetica della cultivar.

Le colture orticole sono esposte a stress di tipo biotico e di tipo abiotico che possono causare perdite produttive ed economiche ingenti. In particolare, il basilico (*Ocimum basilicum*) è una specie aromatica di grande rilevanza economica mondiale e italiana: si stima che il mercato di piante di basilico in America sia pari a 96.8 milioni di dollari, mentre in Liguria, la produzione annua di Basilico Genovese Dop è di circa 22 mila quintali e di circa 35 milioni di piantine, con un impatto economico pari a circa 6 milioni di euro. La varietà genovese (la cv maggiormente utilizzata è 'FT Italiko') rappresenta una eccellenza del "Made in Italy" ed è utilizzata per il consumo fresco e per la produzione di pesto ligure (la salsa cruda più venduta al mondo).

A partire dal 2003 in Italia e dal 2007 negli USA, intere coltivazioni di basilico sono state pesantemente colpite da *Peronospora belbahrii*, un parassita fungino che provoca perdite di prodotto anche del 90%.

Le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) si pongono come un'efficiente biotecnologia per il miglioramento genetico di caratteri di interesse, in un'ottica di agricoltura sostenibile che mira ad eliminare l'impiego di fitofarmaci (dannosi per l'uomo e per l'ambiente e capaci di indurre lo sviluppo di ceppi di patogeni resistenti), salvaguardando la salute dell'uomo e del pianeta.

Per migliorare la resistenza del basilico al suo patogeno, si può intervenire a livello molecolare, individuando e spegnendo geni di suscettibilità che si attivano quando il fungo riconosce la pianta come suo bersaglio. Tra i geni di suscettibilità in basilico, ne sono stati individuati due.



**Fig. 1** Ottenimento del basilico "Italiko" resistente a *Peronospora* tramite le TEA, dalla rigenerazione *in vitro* alle piante adulte. Foto di Marina Laura e Marco Savona (CREA-OF)

## La ricerca: dall'esperienza CREA con il progetto BIOTECH-GEO a quella USA

Nell'ambito del progetto BIOTECH-GEO (Biotecnologie sostenibili per l'agricoltura italiana – Genome Editing in *Ocimum*), finanziato dal MASAF, presso il CREA-Centro di Orticoltura e Florovivaismo e mediante l'utilizzo delle TEA, è stato inattivato (editato) uno dei geni di suscettibilità nella cultivar di basilico 'Italiko'. Sono state quindi prodotte delle piante con una resistenza migliorata a *Peronospora*, mantenendo il profilo aromatico e l'identità genetica della cultivar.

Le TEA hanno permesso di intervenire sulla problematica del basilico in tempi estremamente brevi, con costi di sviluppo contenuti; inoltre hanno salvaguardato la varietà commerciale sinora ottenuta in anni di selezione e permetteranno coltivazioni ad impatto ambientale tendente a zero.

Recentemente, la patologia causata da *Peronospora* è stata affrontata anche da gruppi di ricerca americani (New Jersey e Hawaii), che confermano l'efficienza delle TEA in altre cultivars di basilico dolce coltivato e commercializzato negli Stati Uniti.

#CREABREAK per #innovazione2020: il #miglioramentogenetico di #OrticolturaFlorovivaismo

<https://www.youtube.com/watch?v=XFIRQkEgX8s>



# Agrumi: stessa identità, nuove qualità

Di Ciacciulli / Licciardello



La diversificazione delle varietà di agrumi è stata ottenuta dalle selezioni operate prima dagli agricoltori e poi dai breeder, conservando le mutazioni migliorative e scartando le altre. Oggi le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) permettono di ottenere le mutazioni migliorative desiderate in minor tempo e con una precisione quasi chirurgica. Quindi, a differenza degli agenti mutageni, con le TEA è possibile mantenere invariata l'identità e la peculiarità genetica delle varietà tipiche e migliorarle anche solo per una singola mutazione vantaggiosa

Gli agrumi, originari del sud est asiatico, sono arrivati in Italia secoli fa, e qui si sono ambientati e diversificati, divenendo patrimonio culturale, parte integrante del panorama paesaggistico e della tipicità locale, sia con i prodotti freschi che trasformati. Gli agrumi più coltivati derivano dall'incrocio naturale tra poche specie antiche, come pummelo, mandarino selvatico e cedro. Il limone, ad esempio, deriva da cedro e arancio amaro, a sua volta ibrido di mandarino e pummelo. Anche arancio, pompelmo e clementine sono ibridi di mandarino e pummelo, ma sono figli di incroci ripetuti con uno dei due genitori. Gli agrumi che hanno avuto origine secoli fa hanno mantenuto la loro identità, come essenza della commistione dei caratteri ereditati dai loro genitori; infatti, grazie al tipo di riproduzione sessuale che gli deriva fondamentalmente dal mandarino e che prende il nome di apomissia, i semi di questi agrumi sono cloni della pianta madre. Questo vuol dire che, una volta generato l'incrocio e fissati i caratteri, questi si sono mantenuti nel tempo.

## Perché gli agrumi hanno bisogno delle TEA?

In generale, a diversificare le varietà è stata la selezione fatta prima dagli agricoltori (volutamente o accidentalmente) e poi dai *breeder*, conservando le mutazioni migliorative e scartando le altre. In questo modo hanno

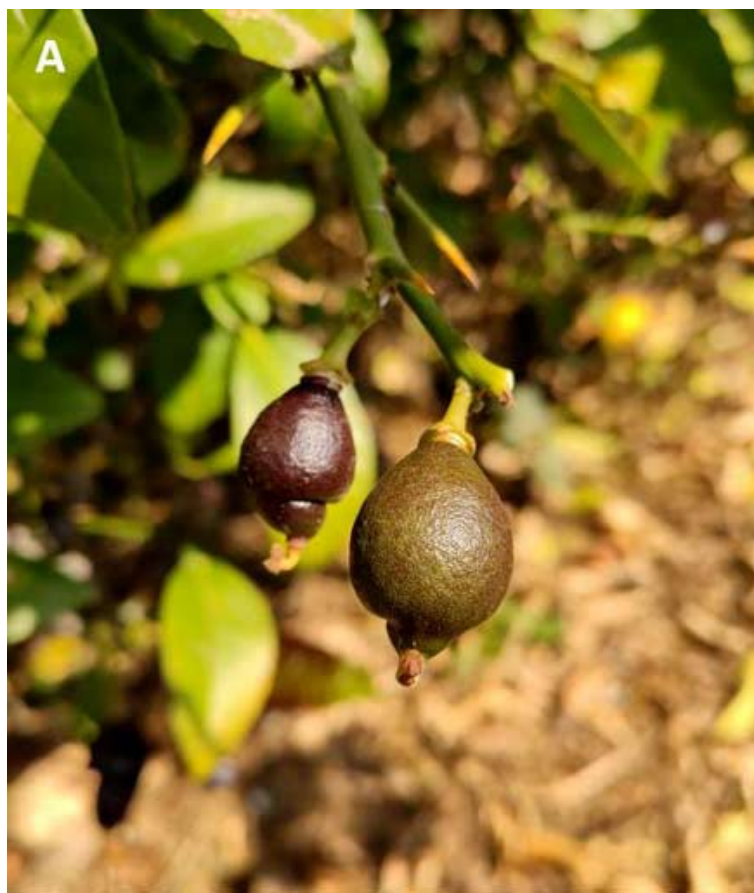


operato facendo "selezione clonale", col tempo divenuto uno dei principali strumenti operativi per i genetisti degli agrumi.

La scoperta di agenti in grado di incrementare la comparsa di mutazioni casuali ha dato una spinta al miglioramento genetico classico, di cui un esempio è stato l'ottenimento di pompelmi rosa e senza semi. Se – da un lato – gli agenti mutageni hanno accelerato la comparsa di mutazioni utili (che naturalmente si verificherebbero molto meno frequentemente), sebbene in maniera del tutto casuale – dall'altro lato, però – è improbabile riprodurre la stessa mutazione in diverse varietà. Oggi le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) permettono di ottenere le mutazioni migliorative desiderate in minor tempo e con una precisione quasi chirurgica. Quindi, a differenza degli agenti mutageni, **con le TEA è possibile mantenere invariata l'identità e la peculiarità genetica delle varietà tipiche e migliorarle anche solo per una singola mutazione vantaggiosa.**

Certamente queste **nuove tecnologie hanno dei limiti: possono essere utilizzate solo se si ha (I) la capacità di rigenerare la varietà da migliorare partendo da una o poche cellule modificate, (II) la conoscenza dei geni da migliorare o delle mutazioni da riprodurre.** Quindi, conoscere la peculiarità di una specie permette di riprodurla nelle varietà in cui quelle mutazioni non sono (ancora) insorte, ma che potrebbe succedere in un tempo indefinito.

Gli agrumi non sono così semplici da studiare e quindi da migliorare, a differenza ad esempio di alcune specie erbacee. È pertanto sufficiente disporre di un buon genoma sequenziato dell'agrumo che si vuole migliorare per poter individuare i geni già scoperti in altre specie. A quel punto questi verranno cercati nel DNA degli agrumi sequenziati, modificati e ne verrà valutato l'effetto sia a livello molecolare che fenotipico, quindi osservabile esternamente. Con questo approccio si ricorre al **"trasferimento orizzontale"** delle conoscenze fra le specie e, laddove non è possibile intervenire partendo dalla coltura di nostro interesse, si attinge alla conoscenza di quanto già noto in specie meno complesse.



## TEA per la qualità dei frutti di agrumi nel mondo

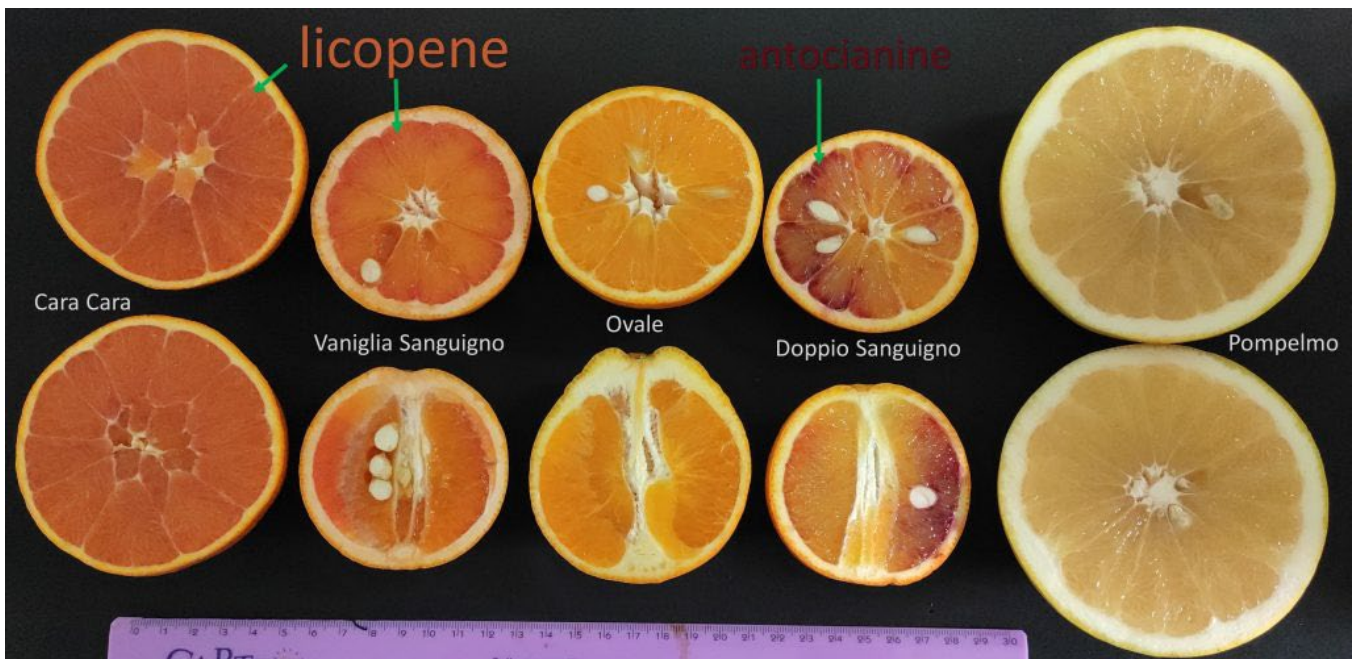
Negli agrumi uno degli obiettivi principali del miglioramento genetico, usando sia un approccio classico sia moderno come le TEA, è indirizzato alla qualità dei frutti in senso lato, includendo tutti gli aspetti che contribuiscono a **portare sulla tavola dei consumatori prodotti, appunto, di qualità**. Dal 2014 ad oggi sono stati pubblicati alcuni studi che hanno visto in prima linea l'utilizzo delle TEA per migliorare diversi aspetti della qualità degli agrumi. Un esempio riguarda l'editing del gene *Tiller Angle Control 1* in arancio al fine di **cambiare l'architettura delle piante**, perché anche questo aspetto può contribuire al miglioramento della qualità del frutto, in quanto viene semplificata la gestione delle piante in modo da aumentarne l'efficienza produttiva. Inoltre le spine, che possono essere piuttosto numerose nei rami delle piante di agrumi, feriscono i frutti rendendoli non commerciabili e soprattutto più esposti a malattie. Uno studio è stato indirizzato a **eliminare le spine**, tramite editing dei geni *THORN IDENTITY1* e *THORN IDENTITY2* in Carrizo, tipico portinnesto degli agrumi.

Esperimenti di "trasferimento orizzontale", dedicati più specificatamente al frutto, sono stati eseguiti su un "mandarino cinese", la *Fortunella hindsii*, agrume ornamentale la cui peculiarità è rappresentata dall'essere dotato di una fase giovanile di pochi mesi (a differenza di tutti gli agrumi che invece fioriscono e producono frutti anche dopo 10 anni), quindi perfetta per valutare caratteri del frutto in poco tempo. In questo minicitrus ricercatori cinesi hanno provato a **bloccare il processo attraverso cui i carotenoidi vengono convertiti in apocarotenoidi**, rompendo il gene *CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE4*. In questo modo viene **favorito l'accumulo dei carotenoidi, i composti che conferiscono il tipico colore arancione a tanta frutta e verdura, già descritti come sostanze antiossidanti importantissime per la salute umana**. Nella stessa specie altri ricercatori cinesi hanno provato a **produrre frutti senza semi** "spegnendo" due geni già descritti in arabidopsis (specie erbacea utilizzata come modello per tutte le piante, per via della sua semplicità), *DUO POLLEN 1* e *SPOROCYTELESS*. Purtroppo, nessuno di questi esempi di "trasferimento orizzontale" ha dato il risultato atteso, dimostrando che, in una base genetica troppo diversa, la singola mutazione può non avere l'effetto sperato.

## Il ruolo del CREA nell'utilizzo delle TEA per migliorare la qualità degli agrumi

Nell'ambito del programma BIOTECH, il progetto CITRUS ha rappresentato un'importante opportunità per l'Italia – e in particolare per il CREA – perché per la prima volta le TEA sono state utilizzate per migliorare la qualità dei frutti di agrumi. Il Centro Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura (CREA-OFA) di Acireale ha applicato con successo queste tecnologie, formando giovani ricercatori e portando in casa il *know-how* per ogni fase del processo che sottende l'utilizzo delle TEA, ottimizzando costrutti *marker-free* (necessari per produrre piante libere da DNA estraneo alla varietà che si vuole migliorare) e protocolli per rigenerare le varietà tipiche del territorio italiano, come le varietà di arancio 'Doppio Sanguigno', 'Tarocco', e 'Vaniglia Sanguigno'.

In collaborazione con la Fondazione Edmund Mach il *genome editing* e la cisgenesi sono state utilizzate per tentare di **produrre agrumi i cui frutti sono arricchiti in composti nutraceutici** come antocianine (la sostanza che colora di rosso intenso le arance siciliane) e licopene (il composto che conferisce il colore rosa al pompelmo) molto salutari per l'uomo.



**Figura 1**

È stato pubblicato il primo lavoro che ha dimostrato la fattibilità del *genome editing* su varietà di arancio con antocianine, intervenendo sul gene *b-cyclase 2*, coinvolto nella conversione del licopene in b-carotene. Per lo stesso fine è stata applicata anche la cisgenesi, inserendo in varietà con licopene (come il pompelmo rosa 'Star Ruby' e l'arancio 'Vaniglia Sanguigno') il gene *Ruby* di arancio 'Moro', già descritto per essere in grado di "accendere" la sintesi di antocianine.

In collaborazione con l'Università di Catania, il CREA ha lavorato per **togliere i semi nei frutti** di alcuni agrumi, generalmente mandarini, in modo da permettere di **rivalutare quelle varietà tipiche dal sapore e profumo inconfondibile**, ma ormai quasi fuori mercato per la forte presenza di semi. In questo caso è stato editato il gene *HAIKU 1*, già descritto in arabidopsis come cruciale per il corretto sviluppo del seme.

Nonostante i risultati siano stati già verificati in laboratorio, la lunga giovanilità degli agrumi non permetterà, prima di qualche anno, di vedere fiori e frutti. Per accorciare i tempi, in modo da **anticipare la fioritura**, si è intervenuto sui geni *CENTRORADIALIS (CEN)* e *TERMINAL FLOWER 1 (TFL)*, sfruttando una sola guida in grado di intervenire contemporaneamente su entrambi i geni, così da aumentare la possibilità di "spegnerli" contemporaneamente. Sebbene queste piante non abbiano ancora fiorito, hanno però da subito mostrato un carattere direttamente associato alla modifica che è stata causata, ovvero la conversione delle gemme dormienti in spine.

La produzione di **piante pulite marker-free**, libere da DNA estraneo, è uno degli obiettivi su cui tutta la comunità scientifica fa fronte comune. Il CREA ha sviluppato dei costrutti in cui, allo stesso tempo, è possibile (A) attraverso la cisgenesi di *Ruby* inserire le antocianine negli agrumi contenenti licopene, (B) anticipando la fioritura attraverso l'*editing* di *CEN/TFL*, (C) e produrre "piante pulite" utilizzando un marcatore visivo (per selezionare le piantine migliorate) come *VvMybA 1*, un gene di vite che colora le foglie di viola. Ciò permette, nelle prime fasi, di osservare se le piante sono trasformate e, in una seconda fase, di capire se il gene stesso è stato eliminato, grazie alla cassetta per il *marker free* attivata dopo aver esposto le piante a temperature di 48°C per pochissimi minuti. Le piante ritornate verdi dopo il trattamento termico sono ripulite da tutti gli elementi essenziali per fare editing, ritornando quindi identiche alla varietà originale, tranne per i caratteri aggiunti.



## VVmybA1 come marcatore visivo

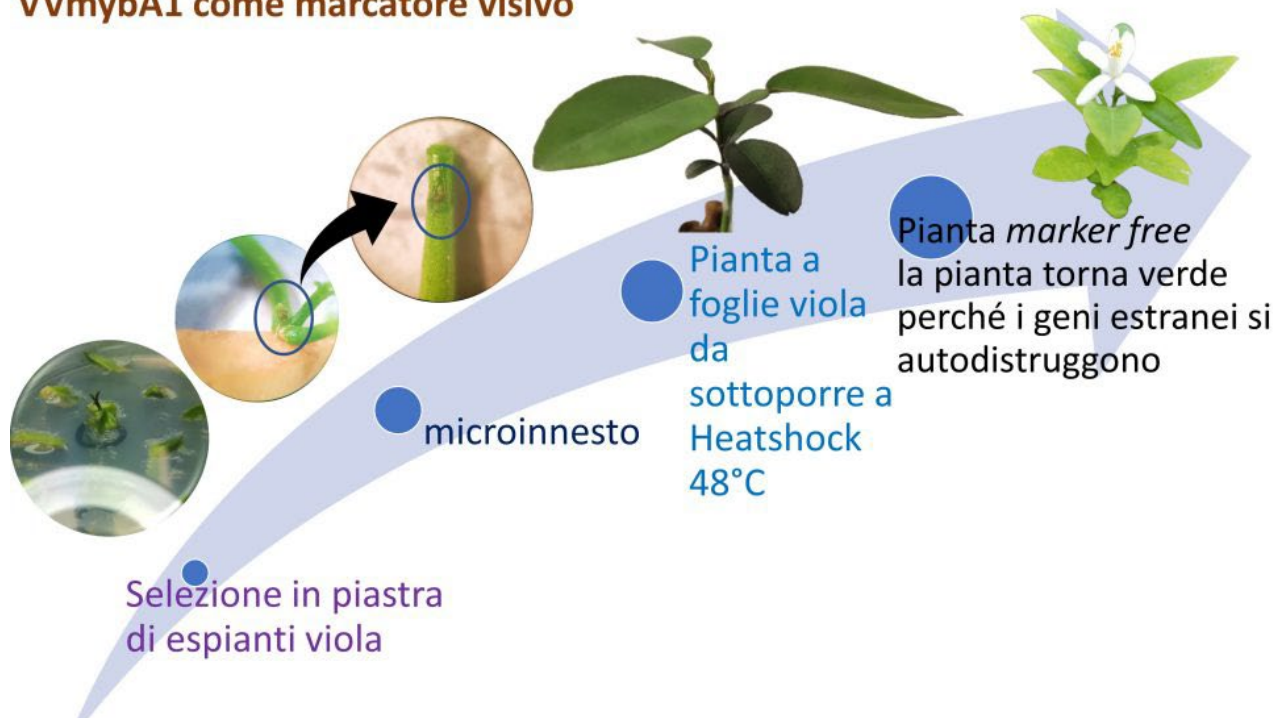


Figura 2

Gli sforzi fatti per spingere la ricerca alla frontiera del settore, in modo da ottenere piante dalle caratteristiche migliorate, senza residui del processo di trasformazione e che vadano presto a frutto, si scontrano oggi con la legislazione vigente. Ciononostante, siamo fiduciosamente in attesa che la proposta di legge presentata in Parlamento lo scorso aprile sia celermente approvata per permettere di valutare queste piante in pieno campo. Solo così sarà possibile valorizzare davvero i prodotti della ricerca di eccellenza Italiana e **salvare l'agrobiodiversità, rilanciando le varietà tradizionali**, dopo aver corretto caso per caso il difetto che l'ha resa obsoleta per anni.

# Agrumi: per le malattie è corsa contro il tempo

Di Ciacciulli / Licciardello



Eliminare porzioni di DNA/geni estranei alla pianta da modificare, così da produrre **editing puliti (marker-free)**, liberi da marcatori), limitando la possibilità di ricadere nella casistica degli organismi geneticamente modificati, è uno degli obiettivi più ambiziosi di quanti usano le TEA per migliorare le piante arboree. Vediamo come il CREA, mediante il genome editing, sta lavorando per ottenere arance e pompelmi resistenti al cancro batterico e alle ultime minacce fitosanitarie.

Gli agrumi rappresentano una delle specie arboree da frutto più diffuse e importanti al mondo, considerate le proprietà salutistiche e l'apporto nutrizionale conferito ai frutti da vitamine, sali minerali, e composti antiossidanti. Per quanto concerne il miglioramento di questa coltura, gli agrumi (in quanto specie arboree da frutto) hanno dei limiti che valgono sia quando si usano gli incroci che le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA), ovvero *genome editing* e cisgenesi.

## Il ruolo delle Tecnologie di Evoluzione Assistita negli agrumi nel mondo

Dal 2014 ad oggi gli agrumi sono stati oggetto di circa 40 pubblicazioni, non tantissime se le paragoniamo ad altri fruttiferi, come ad esempio vite e melo, decisamente di maggior impatto e attorno ai quali si concentrano interessi economici e protezione di marchi di gran lunga superiori agli agrumi e su cui lavorano molte più Istituzioni. Ciononostante, in poco meno di 10 anni, sono state pubblicate diverse review, a firma di gruppi di

ricerca che operano in diversi Paesi, che hanno fatto il punto sullo stato dell'arte e sugli avanzamenti metodologici e scientifici delle TEA in agrumi.

Tenendo conto di quanto velocemente si evolvano queste tecnologie dal punto di vista metodologico e applicativo, è possibile leggere lavori che comparano l'efficienza delle proteine Cas (ad esempio, Cas9 e Cas12 entrambe parti integranti del complesso CRISPR/Cas ovvero delle "forbici molecolari" sotto il quale principio scientifico si basa il *genome editing*). Alcuni lavori introducono anche in agrumi la peculiarità dell'*editing* non tanto come modifica di una piccola regione di DNA (*genome editing*), quanto della sostituzione specifica di una base nucleotidica con un'altra (*base editing*), tecnicamente molto più specifica, ma anche più complessa da indurre. Infine, altri lavori sono indirizzati a riprodurre una mutazione in entrambi gli alleli (ovvero in entrambe le copie di un gene), in modo da aumentarne l'efficienza.

Eliminare porzioni di DNA/geni estranei alla pianta da modificare, così da **produrre editing puliti** (*marker-free*, liberi da marcatori), limitando la possibilità di ricadere nella casistica degli organismi geneticamente modificati, è uno degli obiettivi più ambiziosi di quanti usano le TEA per migliorare le piante arboree. Infatti, a differenza delle specie erbacee, come ad esempio i cereali (orzo, frumento, riso, avena) o le ortive come gli ortaggi (pomodoro, melanzane, peperoni), che hanno un ciclo vitale annuale, le specie arboree come gli alberi da frutto hanno un ciclo pluriennale. Ciò vuol dire che nelle condizioni migliori di allevamento muoiono per loro natura dopo diversi anni. Nel caso dei cereali è possibile ottenere piante pulite (*marker-free*) attraverso l'incrocio. Diversamente, le piante arboree impiegherebbero anni per ottenere lo stesso risultato. Quindi, bisogna trovare dei sistemi che, già in fase di utilizzo delle TEA, siano in grado di eliminare il DNA estraneo.

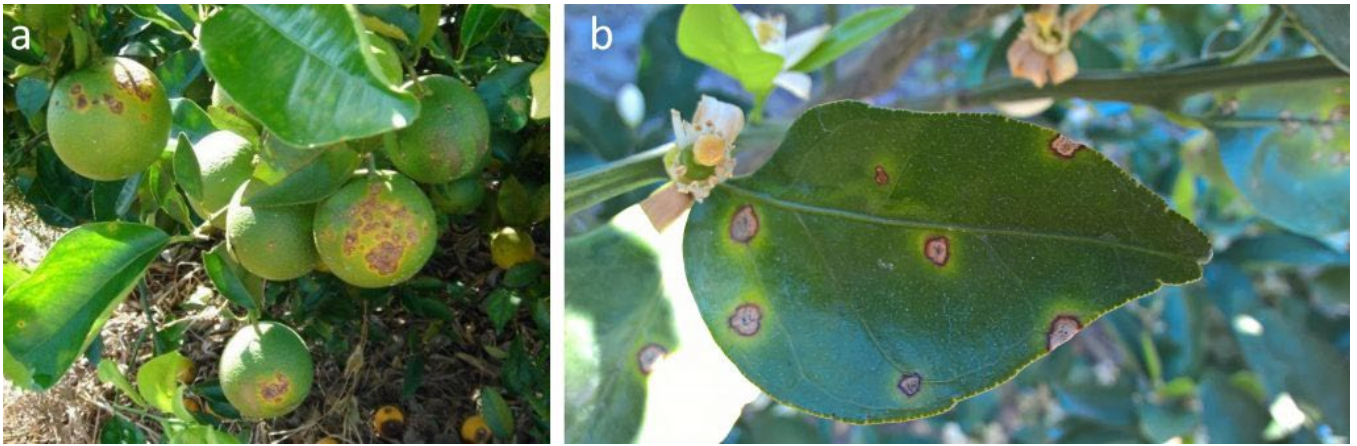
Un gruppo di ricercatori spagnoli in collaborazione con l'Università di Catania ha messo a punto una *single guide RNA* (sequenza di DNA specifica che, una volta riconosciuta la stessa sequenza nella varietà, produce l'*editing*) e un costrutto per *base editing* capace di sostituire una base nel gene che rende gli **agrumi sensibili all'erbicida imazapyr**, rendendo così le piante resistenti senza dover integrare geni estranei agli agrumi. Questa *single guide RNA*, associata con qualsiasi altra *single guide RNA* per *base editing* di un gene di interesse, permette di migliorare la varietà in questione, senza alcuna integrazione di DNA estraneo, ottenendo direttamente una varietà migliorata *marker-free*.

Un'altra via per ottenere piante *marker-free* sfrutta i **protoplasti**, cellule vegetali che, in quanto private di parete cellulare, posso acquisire in maniera transiente (ovvero, momentanea) la proteina Cas sotto forma di acidi nucleici o riboproteine. Di contro, l'*editing* ottenuto sarà stabile e quindi la modifica sarà trasferita a tutte le cellule che da questa si origineranno, dando vita alla nuova pianta migliorata. Gruppi di ricercatori della Florida hanno ottimizzato la trasformazione dei protoplasti, editando il gene PDS che quando disattivato decolora le foglie.

## Arance e pompelmi resistenti al cancro batterico degli agrumi grazie al genome editing

Sarebbe impensabile usare le TEA senza conoscere il gene che controlla il carattere da migliorare e senza riuscire a rigenerare (produrre una intera piantina da una singola cellula modificata) la varietà migliorata. **In agrumi il maggior numero di studi pubblicati sul genome editing ha riguardato la disattivazione dei geni che conferiscono suscettibilità/sensibilità al cancro batterico (CBC).** Si tratta di una malattia causata da *Xantomonas citri*, diffusa in quasi tutte le aree agrumicole del mondo, ma non nei Paesi che si affacciano sul Bacino del Mediterraneo, sebbene a rischio per via della facile trasmissione della malattia. Il CBC crea lesioni su foglie, steli e su tutta la pianta, che impattano pesantemente sulla qualità dei frutti, deprezzandone la produzione.





Sintomi di cancro batterico degli agrumi (CBC) in (a) frutti con lesioni che tendono a confluire formando aree crateriformi fessurate, e (b) foglie di arancio le cui lesioni di colore verde scuro rotondeggianti tendono ad allargarsi diventando di colore marrone chiaro. (Foto di Marco Causo, CREA Centro di Ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura – Acireale)

Ricercatori della Florida hanno utilizzato, con chiare evidenze di successo attraverso prove in laboratorio, il *genome editing* per **spegnere almeno tre geni diversi che rendono arancio e pompelmo altamente suscettibili al cancro.**

SNP  
PAM \*

Wild type (x85) AGGGCTAAGA **ACTATAGGCGGCGGAGA GAG** GGGATCTGCAAGA  
 -GA (x5) AGGGCTAAGA **ACTATAGGCGGCGGA - - GAG** GGGATCTGCAAGA  
 +1A (x8) AGGGCTAAGA **ACTATAG|CGGCGGAGAAAGAG** GGGATCTGCAAGA  
 +1T (x2) AGGGCTAAGA **ACTATAGGCGGCGGAGATGAG** GGGAGCTGCAAGA

Esempio di genome editing nel gene CsLOB1 che mostra, rispetto alla sequenza non modificata wild type, le delezione (-) di “GA”, l’inserzione (+) di “A” e l’inserzione di “T” (Figura originale da “Genome editing of the disease susceptibility gene CsLOB1 in citrus confers resistance to citrus canker. Jia et al., 2017. Plant Biotechnology Journal 15, pp. 817-823”)

## Il ruolo del CREA in Italia per fronteggiare Greening, Malsecco e Alternaria

Gli agrumi patiscono un'altra minaccia fitosanitaria devastante a livello mondiale, che è il **Greening** (Huanglongbing, comunemente noto con il nome di HLB). Si tratta di una malattia causata dal batterio *Candidatus Liberibacter* veicolato dai vettori *Diaphorina citri* e *Trypza eritreae*, diffusa in Cina, Sud America, Florida e California, Sud Africa, e che ha causato la morte di milioni di alberi e una **riduzione della produzione di oltre il 74% con perdite economiche di centinaia di milioni di dollari**. Purtroppo tutti gli agrumi di cui consumiamo e apprezziamo i frutti (arance, limoni, mandarini, pompelmi, pummeli, clementine, cedri, bergamotti) e altri che vengono utilizzati come portinnesti (agrumi che fungono da intermediari tra la varietà che produce i frutti e il terreno) sono suscettibili a questa malattia, nei riguardi della quale **non esistono cure**. Il Greening colpisce la pianta (impattando sulla produzione e deperendola fino alla morte) e i frutti (rendendoli non commercializzabili perché qualitativamente scadenti).



Sintomi di Huanglongbing (Greening o HLB) in pompelmo con tipica deformazione ed inversione di colore nel frutto (a) e maculature clorotiche gialle nelle foglie (b) (Foto di Marco Causo, CREA Centro di Ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura – Acireale)

Questo significa che, se non si riesce a trovare una soluzione nell'arco di alcuni anni, si corre il rischio che gli agrumi possano scomparire. Nel corso degli anni, il tempo che intercorre dal rilevamento del vettore alla comparsa della malattia si è ridotto sempre più velocemente, passando da oltre 62 anni in Brasile, a poco più di 4 in California. Se pensiamo che i vettori sono stati rilevati in Spagna e Portogallo nel 2014 (*T. erytrae*) e in Israele nel 2022 (*D. citri*), la minaccia per l'agrumicoltura europea è davvero reale. Certamente i cambiamenti climatici stanno contribuendo a favorire la rapida diffusione del vettore e quindi della malattia.

Tutta la comunità scientifica internazionale è concentrata per trovare rapidamente una soluzione, intervenendo con strategie di controllo sui vettori fino ad arrivare alla genetica, sia nella sua accezione classica che moderna. Le uniche fonti di resistenza ricadono in specie molto vicine agli agrumi, con i quali sono sessualmente compatibili, requisito essenziale sia perché è possibile sfruttare l'incrocio per introdurre la resistenza agli agrumi, sia perché è possibile usare le TEA, raggiungendo l'obiettivo in tempi decisamente più brevi.

In Italia il CREA, con il suo Centro di Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (sede di Acireale), ha già completato il sequenziamento del genoma (quindi, ha la conoscenza di tutto il DNA) di una delle due specie resistenti, *Eremocitrus glauca*. Attraverso il confronto tra il genoma delle specie suscettibili già disponibili e quelle resistenti si stanno ultimando le ricerche volte alla **identificazione dei geni responsabili del loro diverso comportamento nei riguardi di questa malattia**. Inoltre, grazie al progetto CITRUS Biotech, sono state acquisite tutte le competenze per produrre i costrutti di *genome editing* e di cisgenesi e sono state ottimizzate anche le soluzioni *marker-free*. Nello specifico, questo approccio è stato ottenuto utilizzando due strategie: la prima sostituendo il gene della resistenza alla kanamicina con un gene che colora di rosso alcune parti delle piantine modificate (in questo modo la selezione avviene attraverso un marcatore visivo) ed è un gene molto simile a quello che rende rossi i frutti di arancio per via della presenza delle antocianine; la



seconda con un sistema di sfruttamento delle regioni di DNA che vengono attivate quando esposte a temperature alte (48°C) per pochi minuti, portando alla eliminazione della porzione di DNA che include la resistenza alla kanamicina e la Cas9. Il CREA ha anche ottimizzato i protocolli di rigenerazione e trasformazione di diverse varietà di agrumi, che sfrutterebbe anche a vantaggio di questa applicazione. Questo vuol dire che, una volta **identificati i geni di resistenza e di suscettibilità, potremmo essere pronti per sviluppare i primi costrutti per fare genome editing e cisgenesi in varietà di arancio e pompelmo.**

Disporre di queste conoscenze mette il CREA Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura (CREA-OFA) in una posizione sicuramente vantaggiosa anche nei riguardi di altre due patologie su cui è attivamente impegnata.

Il **Malsecco** è una malattia causata dal fungo *Phoma tracheiphilus*, che attacca la parte legnosa della pianta. Comparsa all'inizio del secolo scorso, ha registrato un grave peggioramento della produzione limoncola italiana, sia in termini quantitativi che qualitativi.



Sintomi di Malsecco. (a) Dettaglio di rametto di pianta infetta che mostra uno scolorimento del legno giallo o rosa-salmone a rossastro. (b) Pianta di limone Akragas morta a causa di Malsecco. (Foto modificate da "Identification of Field Tolerance and Resistance to Mal Secco Disease in a Citrus Germplasm Collection in Sicily. Russo et al., 2020. Agronomy 10, 1806)

Il CREA e l'Università di Catania hanno prodotto delle popolazioni di incrocio che, anche grazie alla recente disponibilità del genoma del limone Femminello Siracusano, saranno indispensabili per **individuare marcatori e/o geni candidati coinvolti nella suscettibilità/resistenza al Malsecco** su cui poter strategicamente intervenire sfruttando le TEA.

Infine, un'altra malattia che ha un impatto più a livello Europeo è l'**Alternaria** causata dal fungo *Alternaria alternata* che colpisce frutti e foglie.

Sintomi di Alternaria in frutto e foglie di mandarino (Foto di Maria Concetta Strano, CREA Centro di Ricerca Olivicoltura Frutticoltura Agrumicoltura – Acireale)





Il Centro di Acireale ha già sviluppato **due costrutti di genome editing, intervenendo su un gene candidato potenzialmente responsabile della malattia.**

Disporre delle conoscenze tecniche sulle TEA, consente di contribuire a risolvere alcune tra le minacce più pericolose per l'agrumicoltura mondiale, come il greening, collaborando con le Istituzioni site nei Paesi in cui la malattia esiste già, per tentare di fermarla prima che arrivi in Europa.

REQUISITI PER UTILIZZARE LE TEA	HLB	Malsecco	Alternaria
Disponibilità del genoma specie suscettibile/resistente/tollerante	✓	✓	✓
Conoscenza del gene/marcatore/locus associati alla suscettibilità/resistenza/tolleranza	!	!	✓
Tecnologie abilitanti per la produzione di costrutti ( <i>marker-free</i> ) cisgenici/genome editing	✓	✓	✓
Rigenerazione varietà	✓	✓	✓

Inoltre, siamo in grado di "giocare in casa", tentando di risolvere malattie decisamente meno impattanti a livello internazionale, ma che negli anni hanno fortemente limitato l'Italia nei processi di commercializzazione. In questo modo, le TEA contribuirebbero a portare il nostro Paese a riconquistare quegli spazi di mercato di cui un tempo era leader, come nel caso della limonicoltura.

# Fragola: quella del desiderio è rifiorente

Di Verde / Sabbadini / Pietrella



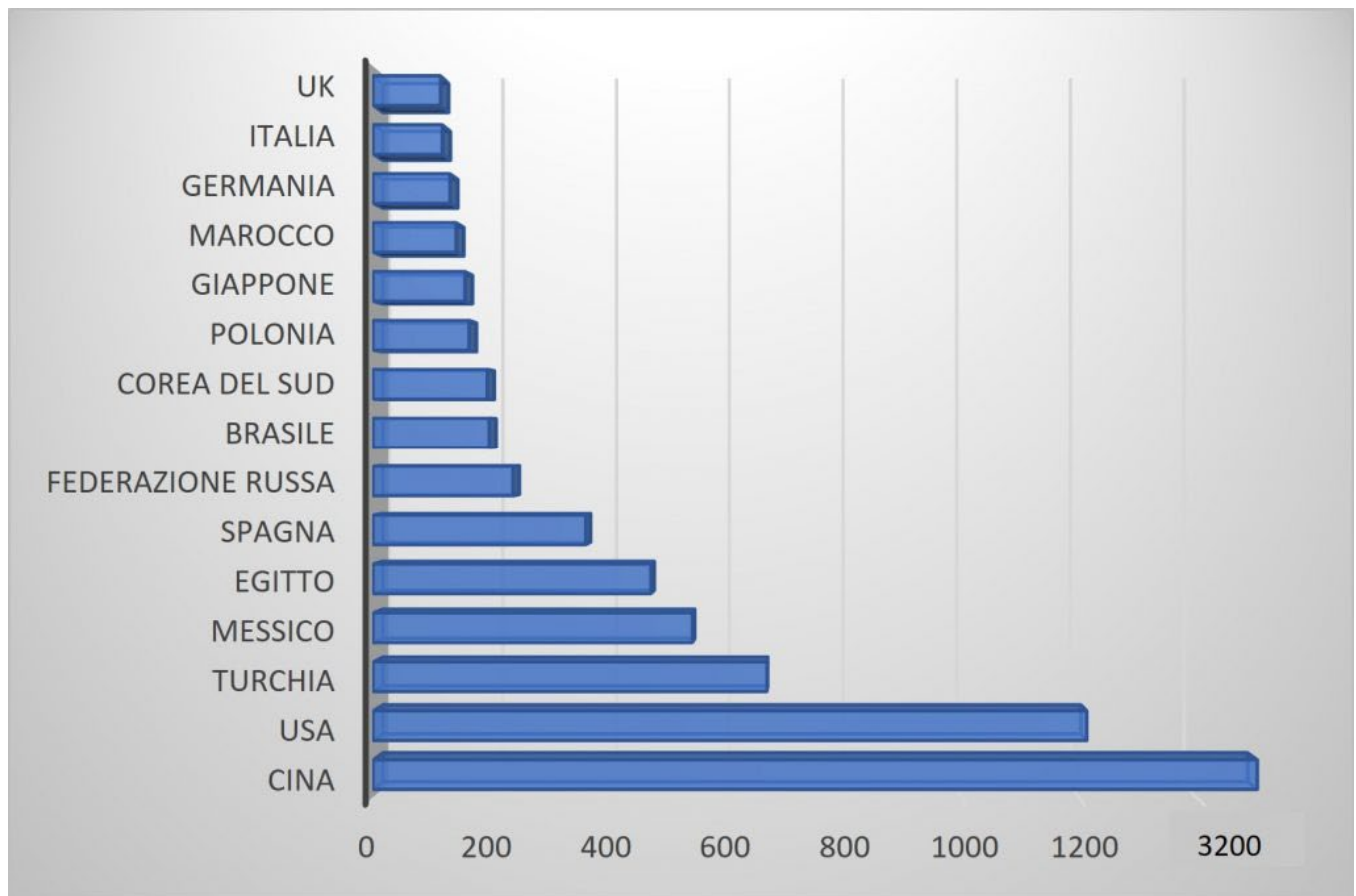
Ricca di importanti elementi nutritivi, quali vitamine, calcio, magnesio, molecole antiossidanti e antinfiammatorie, oltre all'aroma e al gusto dolce, la fragola è uno dei frutti più graditi e commercializzati sull'intero pianeta. Per soddisfare le richieste di un consumatore sempre più esigente sono in atto diverse attività di miglioramento genetico, tradizionale e con le TEA. Cosa sta facendo la ricerca, in particolare quella del CREA? Scopriamolo insieme.

In ogni periodo dell'anno, dai mercati rionali fino ai punti vendita della Grande Distribuzione, i colori e i profumi, che si sprigionano dai banchi, guidano il consumatore verso l'acquisto del frutto preferito: tra questi, la fragola è sicuramente uno dei più amati. Il colore rosso brillante e le sue caratteristiche organolettiche uniche ne fanno quasi un *must* nelle tavole degli italiani, specialmente in questo periodo dell'anno.

## Le fragole

Nel 2021 la produzione mondiale della fragola ha superato i 9 milioni di tonnellate (dati FAO), di cui oltre un terzo proviene dalla Cina. Con una produzione di oltre 117 mila tonnellate, l'Italia raggiunge il 14° gradino al mondo. Nel 2022 c'è stato un rinnovato interesse con un aumento del 4% della superficie coltivata (fonte: CSO Italy). Le prime regioni produttrici sono la Basilicata e la Campania che, con oltre 1.000 ettari a testa, coprono il 50% delle superficie coltivata per un ammontare di oltre 4.100 h. Il Sud Italia raggiunge i 2.600 ettari, mentre il Nord Italia, con un incremento del 9%, arriva a quasi 1.000 ettari, principalmente concentrati in Piemonte, Emilia-Romagna, nel Veronese e nelle province di Trento e Bolzano.

In commercio si trovano molte varietà di fragola, pensate per cercare di soddisfare i desideri dei consumatori e coniugarli con le necessità dei produttori. Ad oggi, queste sono interamente il frutto di attività di breeding tradizionale, ottenute cioè incrociando varietà preesistenti e valutando le caratteristiche delle progenie. Ci sono però tuttora potenzialità enormi per il miglioramento di questo frutto, che, a dispetto del suo successo, presenta ancora diverse criticità. Purtroppo, alcune di queste sono difficilmente superabili con i metodi di selezione tradizionali, anche a causa della complessità genetica della fragola moderna (*Fragaria x ananassa*). **Migliorare la performance produttiva e le qualità organolettiche in condizioni ambientali sempre più estreme ed aumentare la resistenza agli attacchi dei patogeni rappresentano le nuove sfide da affrontare, il tutto in un’ottica di aumento della sostenibilità dei sistemi agricoli e della competitività delle imprese.**



**Figura 1** Produzione mondiale di fragole (x 1.000 tonnellate)

## Le TEA e le fragole

Un aiuto fondamentale in questo senso può venire dalle nuove Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA), strumenti che permettono di apportare modifiche mirate al DNA di un essere vivente. Prescindendo da incroci, consentono di ottenere più velocemente risultati altrimenti difficilmente raggiungibili. Le potenzialità di questi sistemi sono enormi e sono state pienamente comprese dalla comunità scientifica mondiale, con molteplici programmi volti ad utilizzare queste tecniche, anche in fragola e innumerevoli campi di applicazione: dall’aumento della tolleranza a patogeni e stress abiotici all’aumento della produttività, per citarne alcuni.

Diversi sono i progetti focalizzati sulle TEA (in inglese NGT, New Genomic Techniques) come strumento di elezione in programmi di miglioramento genetico di questo frutto. Progetti finanziati dalla Comunità Europea e da altri Stati, ma anche programmi di miglioramento genetico interamente gestiti da soggetti privati hanno dato un forte impulso alla ricerca sulla fragola, con i primi risultati già visibili in grado di impattare sulla qualità del frutto.



È di pochi mesi fa la **pubblicazione di un articolo scientifico sull'inibizione dell'attività di un gene (FaPG1) che controlla la compattezza del frutto, che è risultato essere più sodo e meno soggetto allo sviluppo di muffe** (Lopez-Casado et al, 2023), mentre una azienda statunitense prevede di lanciare sul mercato **entro pochi anni una fragola con un maggiore durata a scaffale**. In ambito europeo la risposta è il **progetto Med-Berry, il cui capofila è l'Università di Bologna, che è focalizzato sulle tre malattie principali di fragola**: il marciume grigio, causato dal fungo *Botrytis cinerea*; l'antracnosi causata da specie del genere *Colletotrichum* e il mal bianco causato da *Podosphaera aphanis*.

## La ricerca del CREA

In questo ambito di ricerca di frontiera, il CREA è stato scelto dall'allora MIPAAF (oggi MASAF) per coordinare BIOTECH, il primo grande progetto nazionale, che utilizza le TEA per il miglioramento genetico vegetale. Nel sottoprogetto BIOSOSFRU, si è scelto di lavorare per indurre il carattere rifiorenza in varietà di fragola ottaploide (ognuna delle sue cellule contiene otto set di cromosomi, mentre le cellule degli esseri umani sono diploidi, ossia contengono due set di cromosomi, uno da ciascun genitore) unifera, che fiorisce una sola volta l'anno. Specie perenni, come la fragola, ripetono i loro cicli ogni anno passando dalla condizione vegetativa a quella riproduttiva; la fioritura rappresenta uno dei più importanti eventi all'interno di questo ciclo. La modulazione dei geni, che controllano la fioritura nella fragola ottaploide (*Fragaria x ananassa*) sarebbe di grande interesse commerciale per la coltura, perché permetterebbe la produzione dei frutti in più periodi dell'anno.

Questa attività è stata svolta in collaborazione tra il CREA e l'Università Politecnica delle Marche.

Sono stati isolati due geni *FT* e *TLF1* nella fragolina di bosco (*Fragaria vesca*) per introdurli nella fragola ottaploide. Per identificare le piante trasformate si è scelto un marcatore che conferisce resistenza al glifosate, un erbicida largamente utilizzato in agricoltura, e sono state utilizzate due cultivar di fragola ottaploide unifere 'Romina' e 'Sveva'. Settecento espianti fogliari delle due cultivar sono stati sottoposti a trasformazione ottenendo 39 linee putativamente trasformate (38 di 'Romina' e 1 di 'Sveva'). Al momento l'inserimento del costrutto è stato dimostrato con analisi genomica in tredici linee di 'Romina' e una di 'Sveva'. Sono attualmente in corso ulteriori analisi per confermare l'introduzione dei geni.

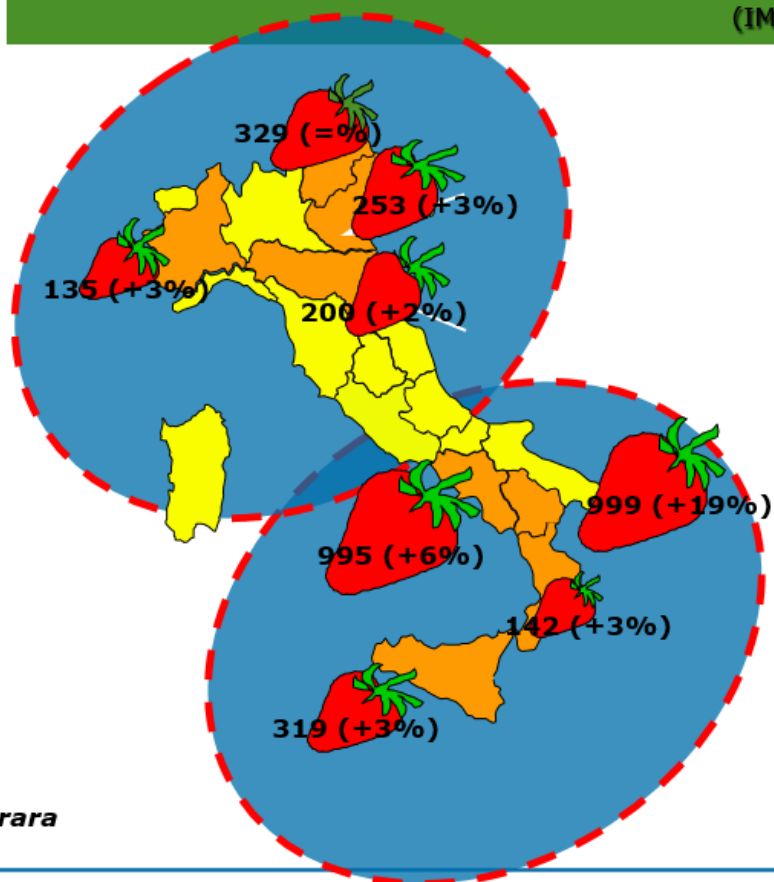
Lo sviluppo di cultivar ottaploidi commerciali con carattere rifiorenza e di alta qualità rimane un obiettivo importante, ma non così facile da raggiungere con l'ibridazione standard. Per questo motivo, sono di grande importanza nuovi strumenti molecolari che favoriscono l'introduzione del carattere nella fragola coltivata.

Le tecniche di ingegneria genetica possono contribuire a migliorare o aggiungere nuovi tratti in fragola: renderla rifiorente, come abbiamo visto, aumentarne la produttività o migliorare la qualità nutrizionale dei frutti. Tuttavia, l'introduzione di geni estranei al genoma di fragola e in generale in pianta, derivanti da altri organismi, non viene accolta positivamente dall'opinione pubblica, e tali prodotti vanno incontro a regolamentazioni molto restrittive, soprattutto in Europa. Negli ultimi anni lo sviluppo delle TEA ha consentito di ottenere piante geneticamente modificate con sequenze derivanti dalla stessa specie o da specie sessualmente compatibili (cisgenesi/intragenesi), come avviene per il breeding tradizionale.

Tramite l'utilizzo di queste tecniche di evoluzione assistita si alza l'asticella dei traguardi ottenibili per il miglioramento genetico della fragola, non soltanto per quanto riguarda produttività e caratteristiche organolettiche, ma anche in termini di sostenibilità ambientale, economica e sociale.

## PRINCIPALI AREE FRAGOLICOLE ITALIANE

(IMPIANTI 2021, ha)



Fonte: CSO, Ferrara

**Figura 2** Principali aree fragolicole in Italia

Lopez-Casado G et al (2023) CRISPR/Cas9 editing of the polygalacturonase FaPG1 gene improves strawberry fruit firmness Hort Res 10 (3) <https://doi.org/10.1093/hr/uhad011>

# Drupacee: una sfida vinta a metà

Di Micali / Monticelli / Vendramin



Pescheto in fiore presso il centro CREA-OFA di Roma. Le TEA possono fornire soluzioni rapide anche in risposta ai cambiamenti climatici che portano all'aumento di eventi estremi come le gelate tardive che causano ingenti danni alle colture.

**Cambiamenti climatici e malattie stanno assestando un duro colpo alla produzione di pesche, albicocche e ciliegie. È necessario, quindi, trovare soluzioni alternative per poter far fronte a queste sfide e le TEA possono rappresentare un'opportunità per rispondere in modo tempestivo ed efficace, riducendo il tempo necessario per ottenere nuove varietà, attraverso un intervento mirato su geni di interesse. Cosa sta facendo la ricerca? Le TEA stanno ottenendo risultati positivi anche per le drupacee?**

La produzione mondiale e italiana di pesche e albicocche è fortemente in calo, a causa di diversi fattori, fra cui malattie e problematiche legate ai cambiamenti climatici (siccità, gelate tardive e inverni troppo miti). Per far fronte a questa situazione devono essere fornite risposte immediate come l'ottenimento di nuove varietà.

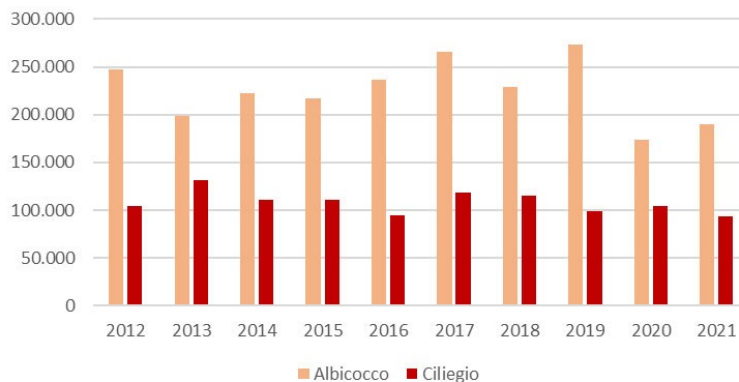


## Ciliegie, albicocche e pesche: produzione in calo nell'ultimo decennio

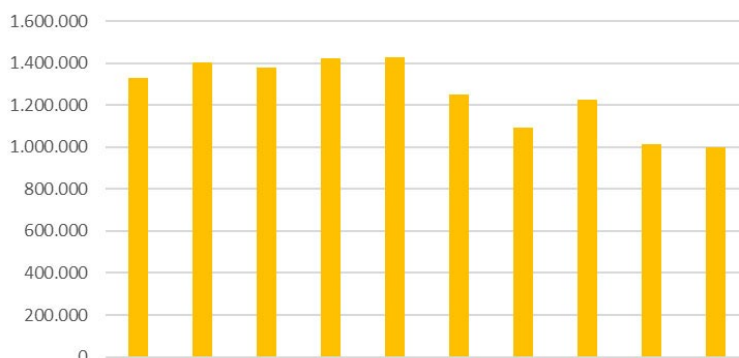
Negli ultimi dieci anni sul territorio nazionale si è assistito ad un calo della produzione delle principali drupacee, che va dal 10 % per le ciliegie al 25 % per pesche e albicocche (Fig. 1). Inoltre, mentre per il pesco la riduzione della produzione corrisponde ad una riduzione del 20 % delle superfici coltivate (Fig.2) per le altre produzioni non c'è una correlazione diretta.

Oggi, il miglioramento genetico rappresenta un'importante risorsa per migliorare il prodotto e ottenere varietà di qualità, appetibili per il mercato e che siano produttive nonostante i cambiamenti climatici che con inverni miti, gelate tardive e siccità influenzano negativamente la produzione e la redditività delle colture.

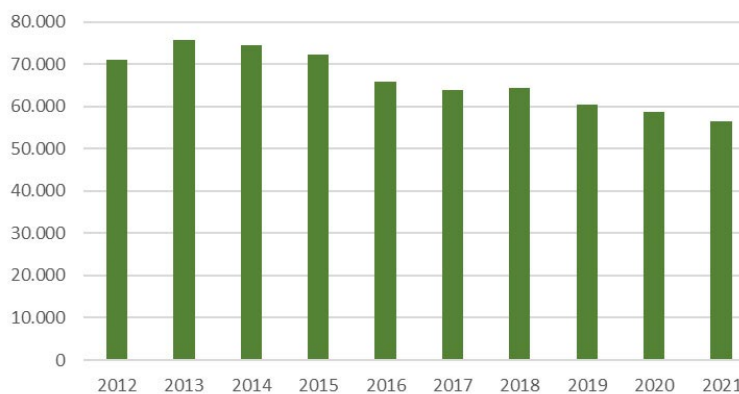
Albicocco e Ciliegio: produzione annua (t)



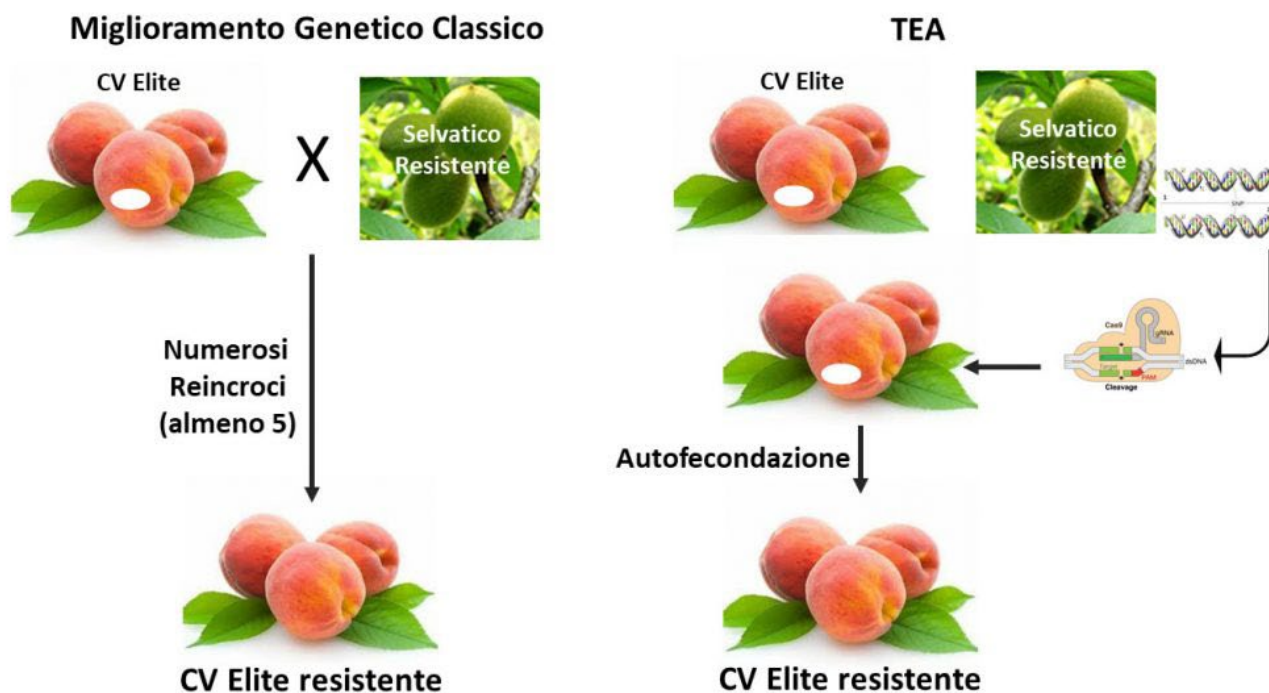
Pesco: produzione annua (t)



Pesco superficie coltivata (ha)

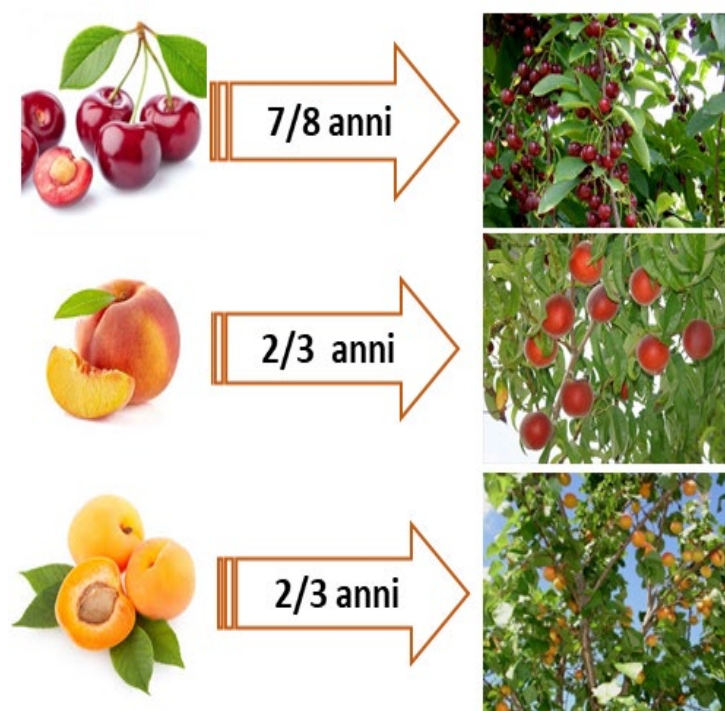


Le attuali conoscenze genetiche e la disponibilità dei genomi sequenziati di pesco, albicocco e ciliegio, consentono di poter utilizzare in queste specie le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) che includono la *cisgenesis* e i metodi avanzati per la modifica del genoma o *genome editing*. Rispetto ai metodi di miglioramento genetico convenzionali, le TEA possono ridurre enormemente il tempo necessario per ottenere nuove varietà, attraverso un intervento mirato su geni di interesse, che di fatto rende queste mutazioni indistinguibili da quelle che si verificano in natura.



**Figura 3** – Confronto fra le TEA e il miglioramento genetico convenzionale

Nelle piante il miglioramento genetico convenzionale si basa su ripetuti cicli di incrocio e selezione dei semenzali (ndr piantina appena nata dal seme) alla ricerca degli individui che presentano le caratteristiche desiderate, come la resistenza alle malattie. **Nelle drupacee (pesco, ciliegio e albicocco) questo processo ha una durata di almeno 15 anni a causa della giovanilità**, periodo in cui le piante non producono frutti, che può durare molto a lungo e richiede l'impiego di ingenti risorse di tempo, spazio, personale e denaro. Anche l'introduzione di resistenze da specie affini, con caratteristiche pomologiche deleterie, dilata fortemente i tempi. Con le TEA una nuova varietà può essere ottenuta già dopo il primo incrocio.



**Figura 4** – Durata periodo giovanile nelle drupacee

Negli ultimi 5 anni, diversi studi riportano l'applicazione delle TEA al miglioramento genetico degli agrumi, della vite e del melo, con particolare riferimento all'introduzione della resistenza a stress biotici e abiotici, alle caratteristiche del frutto come l'arricchimento in composti nutraceutici, mentre **per le drupacee, al momento, non esistono studi in cui siano stati ottenuti genotipi con queste nuove metodologie.**

L'applicazione della TEA richiede da un lato la disponibilità genomica della specie di interesse e la conoscenza dei geni su cui si vuole intervenire, dall'altro la capacità di modificare poche cellule vegetali (trasformazione) da cui si ottiene l'intera pianta (rigenerazione).

Per le drupacee la disponibilità di numerosi genomi sequenziati ha consentito a gruppi italiani e stranieri di disegnare e progettare le forbici molecolari (CRISPR/Cas) dotate di un preciso navigatore satellitare (gRNA), che permettono di agire su alcune caratteristiche importanti come la resistenza alla Sharka, la fioritura precoce e il portamento colonnare. Grazie a queste informazioni sono stati sviluppati **gli strumenti molecolari in grado di:**

- **modificare i geni della pianta affetta da Sharka e che sono necessari al virus per moltiplicarsi.** La Sharka è tra le più gravi malattie che colpiscono il pesco e per la quale non esistono fonti di resistenza.
- **superare le problematiche legate alla giovanilità mediante lo spegnimento di un repressore fiorale con la conseguenza di accelerare la fioritura e di ridurre drasticamente il tempo improduttivo.**
- **ottenere il portamento colonnare, più efficiente nella captazione della luce con conseguente aumento della produzione e migliore qualità dei frutti e adatto alla raccolta meccanizzata e a coltura intensiva. Lo stesso strumento è stato impiegato sia in pesco che in albicocco che in ciliegio.**

La disponibilità di protocolli efficaci ed efficienti di trasformazione e rigenerazione *in vitro* rappresenta il fattore limitante per l'applicabilità delle TEA nel genere *Prunus*, che raccoglie in sé le drupacee.

**L'*Agrobacterium tumefaciens* è il batterio responsabile di una malattia nota come tumore del colletto. In natura, è in grado di trasferire nelle cellule della pianta che ha infettato, porzioni del proprio DNA, integrandole nel genoma della stessa. Le TEA, eliminando i geni alla base della malattia e sostituendoli con i geni di interesse, sfruttano questo meccanismo per modificare in modo puntuale il genoma delle cellule vegetali.**



**Figura 5** – Apici di albicocco infettati con Agrobatterio recante una proteina fluorescente (GFP). Sulla destra gli apici illuminati da luce naturale e sulla sinistra gli stessi illuminati con lampada a fluorescenza che evidenzia la porzione di apice in cui è avvenuto l'ingresso del batterio

L'ottenimento di piante TEA è condizionato, però, anche dalla rigenerazione, cioè dalla capacità delle piante di rigenerare un nuovo individuo da un ristretto numero di cellule. La condizione che deve realizzarsi è che le cellule in cui si è integrata la nuova informazione genetica siano in grado di dare luogo ad un germoglio che,



nelle opportune condizioni di coltura, sia in grado di accrescersi, moltiplicarsi, radicare, ossia, in altre parole, di dare origine ad una nuova pianta.

**Il genere *Prunus*, e soprattutto il pesco più di altre specie, è uno dei più recalcitranti alle manipolazioni a causa di ciò si riscontra una limitata disponibilità di sistemi di rigenerazione e trasformazione efficienti** la cui validità dipende da molti fattori come la cultivar utilizzata, le condizioni di coltura, il tipo di tessuto vegetale considerato e l'identificazione di genotipi di *Agrobacterium* competenti al trasferimento genico.

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella rigenerazione *in vitro* sia da piccioli, foglie, calli di cellule indifferenziate (tessuti somatici) che derivati da seme (zigotici), in Italia e all'estero. Nonostante questo, la probabilità di ottenere piante modificate resta ancora molto bassa e ad oggi **le uniche specie in cui è stato raggiunto un risultato stabile sono susino europeo e cinogiapponese.**



**Figura 6** – Rigenerazioni da tessuti somatici di albicocco (sinistra) e da cotiledoni di pesco (destra)

Vista l'importanza economica delle drupacee, sia a livello nazionale che mondiale, l'interesse all'individuazione di protocolli di trasformazione e rigenerazione efficienti rimane alto, anche al fine di rispondere al mondo produttivo che chiede lo sviluppo di varietà resistenti alle gelate e alla siccità.

# Kiwi: la difesa prima di tutto

Di Michelotti / Caboni / Tacconi



Scopriamo, attraverso il lavoro dei ricercatori CREA Olivicoltura, Frutticoltura e Agrumicoltura e Genomica e Bioinformatica il contributo che le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA) possono svolgere per difendere il kiwi, costantemente minacciato dal cosiddetto “cancro”.

## Non tutti sanno che...

L'actinidia è una pianta perenne, arborea ed arbustiva, rampicante, appartenente alla famiglia delle *Actinidiaceae*, che produce come frutto il kiwi. L'actinidia è una pianta dioica, esistono cioè piante maschili, con fiori che producono molto polline, ben distinte da quelle femminili nelle quali il fiore ha ovuli fertili e polline sterile. Per produrre il frutto è quindi necessario procedere all'impollinazione, sia manualmente sia mettendo a dimora alberi staminiferi. Il kiwi è un frutto molto gradito per il sapore della sua polpa e per le sue proprietà nutrizionali, viene consumato fresco ed oggi anche utilizzato per produrre bevande, dolci e marmellate. La domesticazione del kiwi è iniziata all'inizio del XX secolo e le cultivar disponibili delle due specie commercialmente più importanti *Actinidia deliciosa*, kiwi verde e *A. chinensis*, kiwi giallo, sono il risultato di programmi di miglioramento genetico più recenti, rispetto ad altre specie da frutto.

## Il cancro del kiwi

L'actinidia è stata praticamente esente da malattie fino al 2008, quando è apparso il cancro batterico del kiwi causato dal batterio gram-negativo *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa). La Psa è un'importante malattia del kiwi, di difficile controllo al punto che **le piante affette devono essere estirpate. Ha causato enormi perdite economiche ai maggiori produttori mondiali di kiwi: Cina, Italia e Nuova Zelanda. Si presenta con macchie fogliari, imbrunimento e caduta dei fiori, disseccamento dei germogli, fino alla morte delle piante, con conseguente perdita del frutteto nell'arco di 2-3 anni**





**Figura 1** Sintomi del cancro batterico su actinidia: essudati sul tronco (A) ed a carico della corteccia e del legno (B); Tacche necrotiche fogliari di forma irregolare circondate da aloni giallo (C); essudato batterico ossidato e lattiginoso (D, E rispettivamente); piante estirpate a seguito della diffusione di *Psa* nel frutteto (F).

Il batterio può sopravvivere senza manifestarsi per lunghi periodi nella pianta, la cui invasione avviene attraverso le lesioni e gli stomi aperti, che rappresentano un importante punto di ingresso. La risposta della pianta all'attacco del patogeno è "boicottata" dal batterio stesso, che riduce la capacità di difesa della pianta. Attualmente, il controllo della malattia si basa sull'applicazione di un trattamento preventivo a base di rame, associato ad un analogo con acido salicilico, avente la peculiarità di attivare le difese naturali della pianta. **L'attuazione di programmi di miglioramento genetico tradizionale per l'introduzione della resistenza a *Psa* è resa difficile sia dalle limitate conoscenze delle sue basi genetiche sia dall'assenza di cultivar resistenti. Gli approcci biotecnologici risultano, quindi, utili per superare questi limiti, intervenendo su geni chiave dell'interazione pianta-*Psa*.**

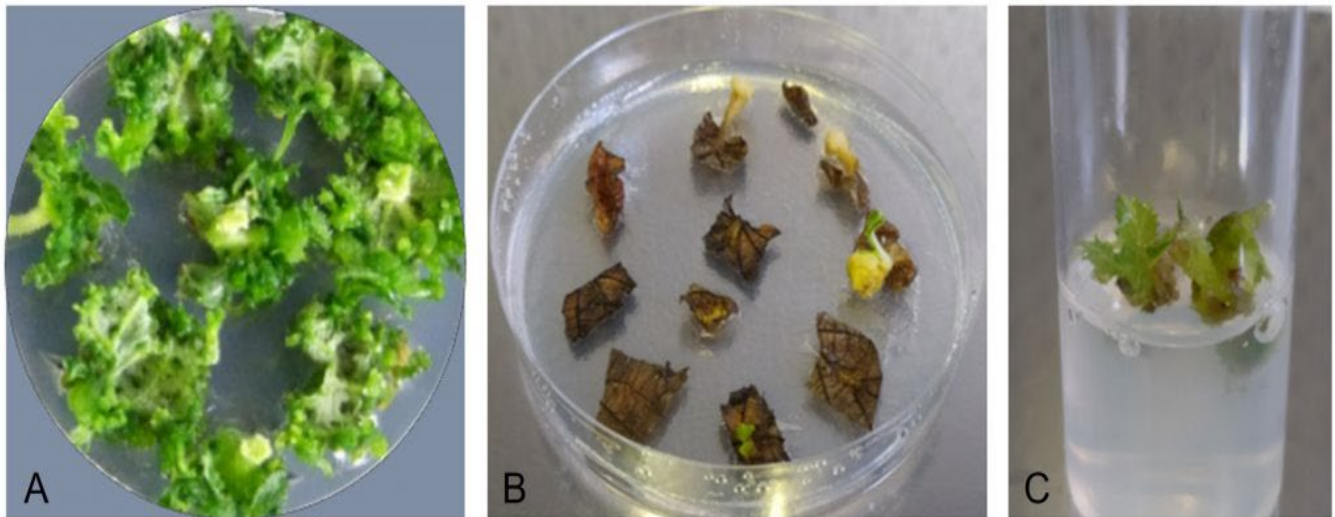
## La ricerca del CREA

In particolare, il "genome editing", mediante tecnologia CRISPR/Cas9, offre la possibilità di modificare in maniera mirata e precisa il genoma della pianta e di indirizzarne la risposta attraverso la modulazione dei suoi stessi geni.

Grazie al [progetto BioSOSFru](#), infatti, è stato possibile approfondire lo studio della funzione di un gene appartenente alla importante famiglia dei fattori di trascrizione AP2/ERF, implicato nella risposta a stress biotici e, in particolare, alla suscettibilità alla malattia.

Su questo gene si sono focalizzati gli esperimenti per l'*editing* del genoma di *A. chinensis* var. *chinensis* utilizzando l'approccio basato su vettori CRISPR/Cas9. I vettori sono stati inseriti nel batterio *Agrobacterium Tumefaciens*, con il quale si sono potute infettare porzioni di foglie di piante di actinidia cresciute *in vitro*.





**Figura 2** Rigenerazione di germogli avventizi da espianti fogliari di *A. chinensis* (A); rigenerazione degli espianti su terreno selettivo dopo infezione con *A. tumefaciens* che porta il vettore per il genome-editing (B); plantule rigenerate di 12 settimane ottenute dai germogli avventizi, in attiva crescita su terreno selettivo (C).

I germogli rigenerati ottenuti sono mantenuti *in vitro* in laboratorio, in camera di coltura, su apposito terreno selettivo, sulle quali sono state condotte approfondite indagini molecolari per determinare le variazioni geniche introdotte.

Sono state riscontrate **due tipologie di mutazioni a livello del gene oggetto di studio, che ne determinano la perdita di funzione ed il suo spegnimento**. Attualmente sono in corso anche le analisi fenotipiche per valutare come il silenziamento mirato di tale gene influisca sulla diminuzione della suscettibilità della pianta alla malattia. Questo studio rappresenta un passo verso la conferma che l'editing del genoma con CRISPR/Cas9 possa essere uno strumento utile per accelerare lo sviluppo di nuove varietà dei fruttiferi.

## Il Kiwi è una importante coltura in Italia

Paese	Superficie ha	Produzione t
Cina	199,138	2,380,787
<b>Italia</b>	<b>24,850</b>	416,060
New Zealand	15,524	628,497
Grecia	12,570	313,390

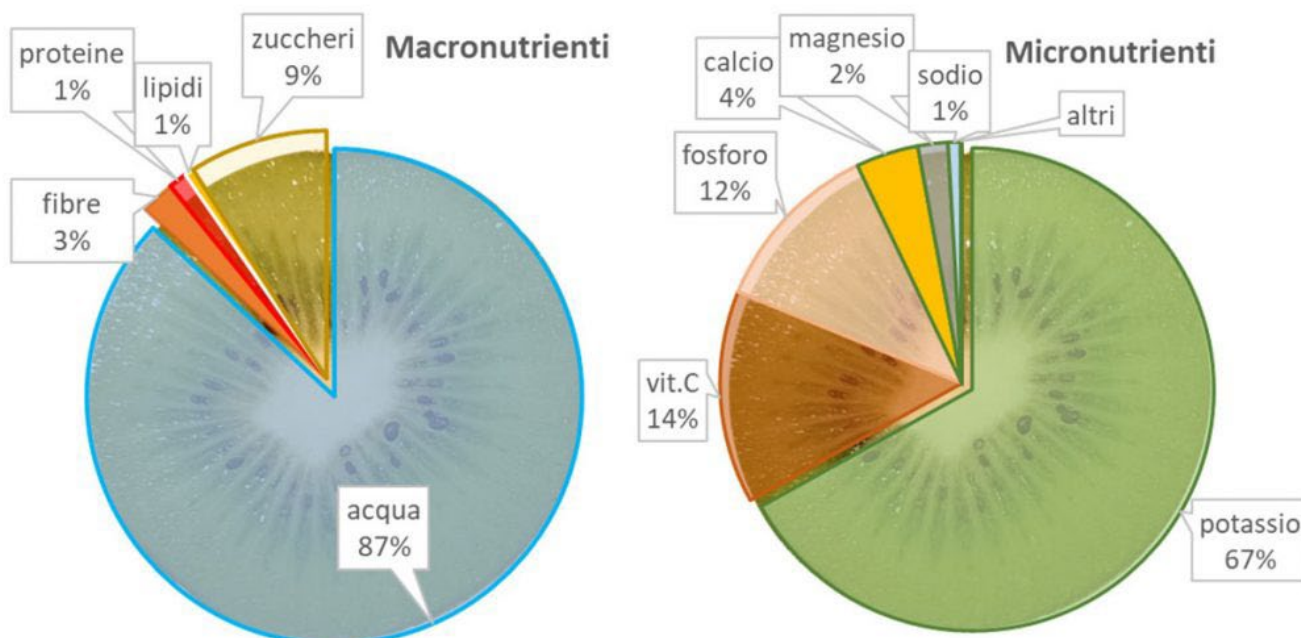
Territorio	superficie in ettari	produzione in quintali
Lazio	8777	2,351,400
Emilia-Romagna	4628	885,016
Piemonte	3209	563,420
Veneto	2932	550,345
Calabria	1561	275,800
Campania	1433	361,061
Lombardia	684	85,059
Friuli-Venezia Giulia	474	49,288
Basilicata	465	79,114
Abruzzo	170	35,250
Puglia	107	24,020
<b>Totale</b>	<b>24440.00</b>	<b>5,259,773</b>



L'Italia risulta tra i principali player mondiali del kiwi sia in termini di produzione che di commercializzazione facendo conoscere al mondo il kiwi "made in Italy". La Cina non commercializza kiwi al di fuori del territorio nazionale ma anzi ne importa. La coltivazione del kiwi in Italia genera un indotto di oltre 1,5 miliardi di euro all'anno. (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> anno 2021). Produzione regionale di actinidia in Italia (rielaborato da fonte ISTAT 2022)

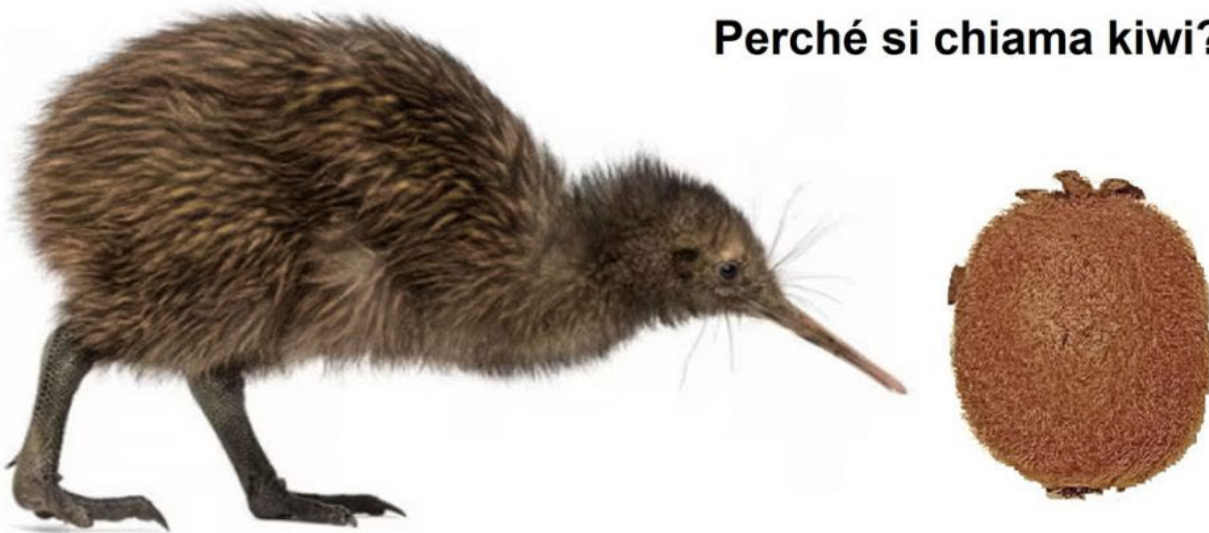
## Il kiwi fa bene alla salute

I kiwi sono importanti fonti di potassio, fibre e antiossidanti. In particolare la quantità di Vitamina C presente in un frutto di kiwi è pari a quello di 3 arance. Gli antiossidanti possono contribuire a neutralizzare i radicali liberi che danneggiano le cellule e il loro DNA. Il kiwi è inoltre fonte di polifenoli e carotenoidi ai quali è stato riconosciuto un valore nella prevenzione delle malattie cardiovascolari.



Il frutto ha un basso apporto calorico: circa 65 calorie ogni 100 grammi di prodotto. La polpa del kiwi è costituita da circa il 3% di fibre. La fibra non viene digerita a livello intestinale, ma una volta giunta nel colon promuove la crescita di batteri benefici. Le fibre hanno anche altri benefici come l'aumento del senso di sazietà, il miglioramento del transito intestinale e la riduzione dell'assorbimento di zuccheri semplici e di grassi. Tratto da <https://www.alimentinutrizione.it/tabelle-nutrizionali/007570>

## Perché si chiama kiwi?



Il kiwi ha origine in Estremo Oriente e per secoli questo frutto è stato coltivato solo in Cina ed era chiamato *yang tao*. Fu solo al principio del XX secolo, più precisamente nel 1904, che sbarcò sulle coste della Nuova Zelanda, quando la neozelandese Isabel Fraser portò con sé alcuni semi di questa pianta di ritorno da uno dei suoi lunghi viaggi e fu chiamata «uva spina cinese»

### **E allora da cosa deriva il nome del kiwi?**

Nel 1959 il nome venne modificato in "kiwi" in onore dell'uccello simbolo della Nuova Zelanda. **Huakiwi**, in lingua māori significa uovo di kiwi. Il frutto ha la forma di un uovo ed ha una peluria che ricorda molto il kiwi uccello.



# La canapa: mille varietà per mille usi

Di Bassolino / Paris / Righetti / Terracciano



Pianta dalle mille proprietà, ricca di acidi grassi essenziali, vitamine, antiossidanti naturali e proteine, la canapa è al centro di un intenso dibattito che la vede protagonista per i suoi molteplici usi, da quello medico per l'elevato contenuto in THC, a quello industriale per l'impiego nei settori tessile, alimentare, nutraceutico, cosmeceutico e farmaceutico, etc. Ma a che punto è la ricerca sulle TEA in quest'ambito? E cosa sta facendo il CREA in tal senso, con il suo Centro?

## Il contesto

"Canapa sì, canapa no", il dibattito sui potenziali benefici e danni derivanti dall'impiego della canapa e dei prodotti da essa derivati è oggi più che mai aperto, così come sulla necessità o meno di supportare lo sviluppo di questo settore. La dicotomia nasce dal fatto che dalla canapa, coltura multiuso con enormi potenzialità e applicazioni in diversi settori, si può anche ottenere una molecola psicoattiva, il THC (Tetraidrocannabinolo). -Da qui l'urgenza di fare chiarezza su questa pianta, soprattutto alla luce delle opportunità offerte dall'emergente applicazione delle Tecnologie di Evoluzione Assistita.

## Il CREA Centro Cerealicoltura e Colture Industriali e la canapa

- Il Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali del CREA (CREA-CI):
- **ha sviluppato otto varietà di canapa industriale iscritte al Registro Nazionale e brevettato le uniche due varietà di canapa medica italiana utilizzate per la produzione di farmaci.**
- ha svolto attività di monitoraggio del tenore di THC nelle coltivazioni di canapa industriale sul territorio nazionale in convenzione con l'AGEA (Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura) e partecipa al Tavolo della Filiera della canapa industriale, istituito dall'attuale Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità alimentare e delle Foreste.
- ha coordinato diversi progetti nazionali sulla canapa e vanta un'importante produzione scientifica nel settore.

## La diffusione ed il valore della canapa nel mondo e in Italia

Raccogliere informazioni attendibili sulla diffusione della coltivazione della canapa e sull'impatto che il suo mercato ha a livello globale è particolarmente complesso. Se, da una parte, in Europa è riportato negli anni 2015-2021 un incremento del 75% degli ettari coltivati per le varietà industriali da seme, fibra e canapulo, sfuggono a queste statistiche le coltivazioni finalizzate all'utilizzo del fiore. Dati più affidabili provengono da Stati Uniti e Canada, dove si è registrata una crescita del mercato di circa 15% su base annua, trainata soprattutto dagli utilizzi terapeutici e ricreativi.

In Italia, la coltivazione di canapa da fibra era ampiamente diffusa fino al secondo dopoguerra, per poi essere abbandonata per decenni fino alla recente rinascita, dovuta all'espandersi di mercati di nicchia e soprattutto alla diffusione della filiera della *Cannabis light* e di prodotti

a base di CBD (Cannabidiolo), una sostanza priva di effetti psicoattivi, non inclusa nell'elenco delle sostanze stupefacenti del DM 309/90. Questo ha portato, verso la fine degli anni 2010, ad una esplosione della diffusione della coltura, seguita nei primi anni del 2020 da un arresto causato da un panorama legislativo inadeguato e poco chiaro. Nonostante ciò, l'interesse per questa coltura dalle "molteplici finalità" rimane alto e, a supporto del suo rilancio, nel 2021 l'allora Ministero delle Politiche Agricole ha costituito il Tavolo della Filiera della Canapa Industriale con l'obiettivo di predisporre un piano di settore, che possa sostenerne e incentivarne la produzione, promuovendo la ricerca e l'innovazione tecnologica in questo settore.

Diverso, invece, il discorso sul settore della canapa medica in Italia, all'interno del quale lo Stabilimento Chimico Farmaceutico Militare di Firenze produce infiorescenze femminili (FM1 e FM2) da due varietà di canapa sviluppate dal CREA-CI per uso medico, che vengono distribuite alle farmacie per la produzione di farmaci soggetti a prescrizione medica.



## C'è canapa e canapa

Pur appartenendo alla stessa specie *Cannabis sativa* L., le piante di canapa risultano molto diverse per aspetto e utilizzo, tanto da poter essere distinte in **canapa industriale e canapa medica**.

Entrambe le tipologie possiedono una molteplicità di molecole bioattive. La differenza principale risiede nei **cannabinoidi** ed in particolare nel THCA, l'acido D9-tetraidrocannabinolico, da cui deriva l'unico composto



psicoattivo della canapa, il THC. La canapa medica è caratterizzata dalla presenza di un contenuto elevato in THC nelle infiorescenze femminili, mentre la canapa industriale è caratterizzata dalla prevalenza di CBDA (acido cannabidiolico) o di CBGA (acido cannabigerolico) e da un livello di THC per legge inferiore allo 0.3% (0.2% fino al 2022) del peso secco dell'infiorescenza. I settori di impiego della canapa industriale sono svariati (tessile, alimentare, nutraceutico, cosmeceutico e farmaceutico, etc) e prevedono l'utilizzo di diverse parti della pianta.



**La sede di Bologna del CREA-Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI) ha un'esperienza pluridecennale nel miglioramento genetico della canapa.** Fra la varietà italiane industriali iscritte al Registro Nazionale delle Varietà, **otto sono state ottenute dopo anni di selezione volti ad eliminare il THC da vecchie varietà ed ecotipi italiani.** Tuttavia, in queste varietà persiste l'accumulo di un quantitativo di THC, detto "residuo", che si mantiene solitamente sotto il limite legale, ma che può variare in risposta a diverse condizioni ambientali e climatiche, sempre diverse di anno in anno, ed è pertanto tenuto sotto controllo in fase di coltivazione, a livello Europeo.

## La base genetica dei cannabinoidi

L'accumulo dei cannabinoidi è dovuto alla presenza nel genoma di canapa di geni che codificano per specifici enzimi chiamati **sintasi dei cannabinoidi**.

Un recente articolo del CREA evidenzia l'esistenza inattesa di questi enzimi attivi in varietà di canapa da seme





certificata. D'altra parte, è stato osservato che il THC residuo si può accumulare, anche in assenza dello specifico enzima deputato alla sintesi. Secondo un'ipotesi largamente accettata, questo potrebbe essere dovuto all'azione aspecifica degli enzimi che producono principalmente CBD.

## Le TEA applicate alla canapa: a che punto è la ricerca?

L'applicazione delle TEA alla *C. sativa* è difficile e, nonostante l'evidente interesse di molteplici attori, non esistono ad oggi articoli scientifici che le vedano utilizzate per l'ottenimento di nuove varietà. La letteratura propone studi che ne dimostrano la fattibilità metodologica, utilizzando geni cosiddetti marcatori, il cui editing produce piante con fenotipo caratteristico (ad esempio albino o pigmentato). Tuttavia, la scarsa efficienza e riproducibilità di questi protocolli, li rende difficilmente trasferibili ad altre varietà. Quindi **per il miglioramento genetico con le TEA c'è ampio spazio di ricerca e sviluppo nel settore della canapa sia industriale sia medica.**

Al momento solo grandi aziende private stanno sviluppando nuove varietà di canapa, grazie all'utilizzo delle nuove tecnologie: quindi t per esigenze di brevetti, questi risultati non sono oggetto di pubblicazioni pertanto non sono facilmente riproducibili. L'interesse delle imprese è quello di **ottenere varietà di canapa, che accumulino singoli cannabinoidi per ottenere un prodotto finale facilmente standardizzabile: questo vale sia per i cannabinoidi principali (THC, CDB e CBG) che per alcuni cosiddetti minori, come il THCV, una variante del THC che controlla l'appetito, con elevate potenzialità terapeutiche nel controllo dei disordini alimentari.**



# Il CREA Centro di ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali e la ricerca sulla canapa

## A caccia di geni

Storicamente gli studi sulla canapa si sono concentrati sulla comprensione delle basi genetiche che determinano l'accumulo dei cannabinoidi. Nell'ambito del recente progetto PON Ricerca e Innovazione UNIHEMP, le ricercatrici del CREA-CI di Bologna hanno identificato le sequenze di DNA responsabili della sintesi e della regolazione non solo dei cannabinoidi, ma anche di altre due classi di molecole bioattive: **terpeni e flavonoidi**. Queste sono importanti nella definizione dell'aroma della pianta e delle sue proprietà salutistiche e antinfiammatorie. Come supportato da evidenze scientifiche, l'insieme di tutte queste molecole può produrre un **effetto sinergico**, spiegando anche perché molti pazienti riportino maggiori benefici facendo uso dell'infiorescenza intera piuttosto che del singolo principio attivo.

**Le ricerche del CREA-CI di Bologna hanno contribuito a migliorare la comprensione dei meccanismi di sintesi e regolazione di queste tre classi di metaboliti, identificando numerosi geni chiave e aprendo possibili ulteriori sviluppi in ambito farmaceutico ed industriale. Le TEA potrebbero permettere l'accensione/spegnimento selettivo dei geni individuati, modulando l'accumulo specifico di molecole di interesse.**

## Micropropagazione e rigenerazione

Micropropagazione e rigenerazione *in vitro* efficaci sono indispensabili per un protocollo TEA di successo. La micropropagazione è una tecnica di coltivazione in sterilità di piante miniaturizzate e fra loro geneticamente identiche e perfettamente sane. La rigenerazione è la capacità, esclusiva delle cellule dei vegetali, di generare un individuo nuovo intero a partire da cellule "indifferenziate".

La **canapa è definita recalcitrante alla coltura *in vitro*** perché è difficile da coltivare *in vitro* e soprattutto da rigenerare; inoltre, la risposta fortemente diversificata del genotipo alle condizioni colturali rende necessaria l'ottimizzazione di protocolli specifici. Tra i fattori da ottimizzare in un protocollo di coltivazione *in vitro* efficiente, vi è sicuramente un buon substrato di crescita.

Presso la sede di Bologna si sta già lavorando per ottenere ricette di **substrati ottimizzati per la coltivazione *in vitro*** di diverse varietà e per diverse applicazioni biotecnologiche. Inoltre, si stanno sperimentando **diversi tessuti di canapa** (foglia, stelo, cellule vegetali prive della parete cellulare note come protoplasti) come **materiali di partenza per sviluppare protocolli più efficienti per la rigenerazione**.

## Nelle TEA il futuro della canapa

L'applicazione di queste nuove tecnologie per l'innovazione varietale è fortemente condizionata dalla conoscenza della funzione dei geni e delle relative regioni regolative, ma al contempo le TEA sono uno strumento per validare la funzione di geni d'interesse.

**Grazie alle TEA si potranno ottenere varietà di canapa medicinale con tenore noto in THC e CBD e sarà possibile rimuovere il THC residuo dalle varietà commerciali di canapa industriale. Questo risultato consentirebbe di coltivare varietà migliorate, eliminando il rischio che il THC superi il limite legale.** Si potranno inoltre attuare programmi di miglioramento genetico per ottimizzare il diverso contenuto in terpeni e flavonoidi, ottenendo varietà che, oltre al settore medico ed industriale, possano trovare impiego anche nell'ambito vivaistico-ornamentale.



Dalla conoscenza dei genomi si potrà arrivare allo sviluppo di nuove varietà di canapa migliorate anche per la produzione di fibra, per la resistenza a patogeni e per la qualità del seme. Una volta identificati i geni candidati per i tratti di interesse, le potenzialità della ricerca sono infinite. Al CREA-CI lavoriamo per poter cogliere al meglio questa opportunità.



# Pioppo: la pianta modello di qualità

Di arra / Biselli / Fricano / Nervo



Per le sue caratteristiche (dimensione del genoma, rapidità nella crescita e nello sviluppo, semplicità nella propagazione e coltivazione) il pioppo è utilizzato come modello per gli studi di genetica e genomica, messo a confronto, attraverso analisi, con altre specie. L'individuazione dei geni che regolano determinati caratteri e lo sviluppo dei relativi marcatori molecolari permettono di implementare i programmi di breeding mediante la selezione assistita da marcatori molecolari, che consente la selezione precoce dei caratteri ritenuti interessanti. Scopriamo insieme le ricerche dei centri Foreste e Legno e Genomica e Bioinformatica

## Il pioppo come pianta modello

Il genere *Populus* include 30 specie tassonomicamente classificate nelle sei sezioni *Populus*, *Tacamahaca*, *Leucoides*, *Turanga*, *Abaso* e *Aigeiros* (Eckenwalder, 1996). Le specie *Aigeiros*, *Populus* e *Tacamahaca* rappresentano quelle utilizzate per le attività di breeding e per lo sviluppo di cloni commerciali.

Specie	Sezione	Uso principale
<b>P. deltoides</b>	Aigeiros	Parentale femminile di <i>P. xcanadensis</i> Parentale di <i>P. xgenerosa</i>
<b>P. nigra</b>	Aigeiros	Parentale maschile di <i>P. xcanadensis</i>
<b>P. alba</b>	Populus	Parentale degli ibridi ottenuti con <i>P. tremuloides</i>
<b>P. tremula</b>	Populus	Parentale femminile di <i>P. xcanescens</i> Parentale degli ibridi ottenuti con <i>P. tremuloides</i>
<b>P. tremuloides</b>	Populus	Parentale degli ibridi ottenuti con <i>P. tremula</i>
<b>P. trichocarpa</b>	Tacamahaca	Parentale di <i>P. xgenerosa</i>
<b>P. maximowiczii</b>	Tacamahaca	Parentale degli ibridi ottenuti con <i>P. deltoides</i>

**Tabella 1** Lista delle specie di pioppo utilizzate per i programmi di breeding per lo sviluppo di cloni commerciali (Biselli et al., 2022)

Nell'emisfero nord il pioppo ricopre importanti ruoli economici, in particolare per l'industria cartiera, la produzione di compensato, la decontaminazione dei suoli dai metalli pesanti, il recupero di ecosistemi fragili, come quelli esposti a desertificazione, e il ripristino dei paesaggi forestali (Bergante e Facciotto, 2015).

Grazie alla piccola dimensione del genoma di circa 500 Mb, suddivise in 19 cromosomi (Tuskan et al., 2006), alla crescita e sviluppo rapidi e ai semplici metodi di propagazione e coltivazione, il pioppo è diventato la specie modello per gli studi di genetica e genomica (Carletti et al., 2016).

Il sequenziamento del genoma di *P. trichocarpa* ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html); Tuskan et al., 2006) è stato fondamentale per gli studi di genetica delle piante arboree, essendo stato il primo genoma di una specie forestale ad essere pubblicato. Successivamente a questo primo sequenziamento, sono state rilasciate altre sequenze genomiche di riferimento: *P. deltoides* (Bai et al., 2021), *P. pruinosa* (Yang et al., 2017a), *P. euphratica* (Ma et al., 2013; Zhang et al., 2020), *P. tremula* e *P. tremuloides* (Lin et al., 2018), *P. alba* (Liu et al., 2019; Ma et al., 2019), *P. simonii* (Wu et al., 2020) e l'ibrido *P. alba* x *P. tremula* varietà *glandulosa* 84K (Qiu et al., 2019; Huang et al., 2021).

**Tali risorse genetiche sono state basilari per le analisi della diversità genetica presente in pioppo e per la costruzione di un pan-genoma rappresentativo delle varianti genetiche strutturali presenti in questa specie** (Pinosio et al., 2016). Inoltre, l'assemblaggio dei genomi di pioppo ha aperto la strada allo sviluppo di migliaia di marcatori molecolari, basati su mutazioni di singole basi del DNA (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNP) e distribuiti su tutto il genoma, i quali consentono di sviluppare dei sistemi automatizzati e a basso costo per la genotipizzazione (ossia la definizione delle differenze nel corredo genetico di individui tramite l'esame della sequenza del DNA) simultanea di centinaia/migliaia di piante diverse



## Il progetto europeo B4EST (Adaptive BREEDING for Better FORESTs)

Nell'ambito del progetto europeo B4EST (Adaptive BREEDING for Better FORESTs; <https://b4est.eu/>), il CREA in collaborazione con altri centri di ricerca europei, ha contribuito a sviluppare 13400 marcatori molecolari SNP, distribuiti su tutto il genoma di pioppo, che sono stati inseriti in un sistema commerciale di genotipizzazione di quattro specie forestali, denominato 4TREE array e caratterizzato da un supporto solido, al quale sono associate migliaia di microscopici segmenti di DNA (sonde), ognuno corrispondente a uno specifico SNP, i quali, in seguito a ibridazione con il DNA di un individuo, permettono di definire le varianti di sequenza ad ogni marcatore. Il 4TREE array è stato utilizzato per genotipizzare due popolazioni di pioppo costituite da centinaia di piante derivanti dall'incrocio tra individui resistenti all'afide lanigero (*Woolly poplar aphid* – WPA) con individui suscettibili ad esso. E' stata inoltre valutata la resistenza/suscettibilità all'afide di ognuno degli individui delle popolazioni e i dati sono stati associati ai dati genetici registrati in precedenza. Tale analisi ha portato alla definizione di regioni del genoma di pioppo implicate nella resistenza a WPA.



Incroci di pioppo

### La selezione genomica in pioppo

L'individuazione dei geni/*loci* che regolano determinati caratteri e lo sviluppo dei marcatori molecolari associati ad essi, permettono di implementare i programmi di breeding mediante la selezione assistita da marcatori molecolari, che consente la selezione precoce per caratteri fenotipici di interesse, evitando le



costose fenotipizzazioni (ndr ossia l'analisi visiva delle caratteristiche morfologiche e funzionali), che richiedono molto tempo, spazio e forza lavoro. Tuttavia, il successo alla base di un ibrido di pioppo è dovuto alla combinazione di numerosi geni diversi, ciascuno dei quali contribuisce con un piccolo o piccolissimo effetto alla *performance* complessiva della pianta. Esempi di **caratteri di rilevanza del pioppo, controllati da decine o centinaia di geni, sono la qualità del legno, la velocità di accrescimento e la resistenza ad avversità biotiche ed abiotiche.**

Per valutare l'effetto complessivo di tutti questi geni sulle caratteristiche morfologiche e funzionali oggetto di studio durante il processo di selezione, è possibile utilizzare la predizione genomica (***Genomic Prediction – GP***). **La GP usa modelli matematici per combinare dati fenotipici e dati relativi ai marcatori molecolari per stimare il valore genetico degli individui. In questo modo è possibile predire la manifestazione di un carattere di un individuo analizzando solo il suo DNA.** I modelli matematici vengono calcolati integrando i dati genetici e le caratteristiche morfo-funzionali registrate per una popolazione di riferimento (*training population*) costituita da poche centinaia di individui. Successivamente, essi vengono utilizzati per stimare il fenotipo di qualsiasi altro individuo, per esempio piante di pioppo da selezionare, a partire soltanto da dati genetici.



Pioppeto

Nel pioppo, così come in altre specie arboree, l'espressione dei caratteri di interesse, quali quelli legati alla qualità del legno, avviene nelle piante adulte le quali raggiungono la maturità in circa 7-8 anni. In piante con un lungo ciclo di crescita come questa specie, la GP è uno strumento che permette di selezionare le piante giovani che ancora non esprimono i caratteri di interesse e, quindi, di ridurre al minimo il numero di piante da fenotipizzare nelle prove di campo.

Calcolando l'effetto dei singoli marcatori sui caratteri di interesse, rispetto al tradizionale miglioramento genetico del pioppo basato sulla selezione fenotipica, la GP permette di stimare in anticipo il valore genetico degli individui, riducendo la necessità di estese fenotipizzazioni in campo. Inoltre, diversi studi hanno

dimostrato che la GP permette di realizzare un uguale o maggiore progresso genetico per unità di tempo, ad un costo inferiore rispetto alla selezione fenotipica.

Fino a pochi anni fa, il numero limitato di marcatori molecolari disponibile per il pioppo ha ostacolato l'applicazione della GP in questa specie. Le nuove risorse genomiche, come il 4TREE array, hanno contribuito ad implementare la GP nel pioppo e di conseguenza a rendere più efficiente il miglioramento genetico di questa specie.

Il CREA, sfruttando le conoscenze generate nell'ambito del progetto B4EST, ha deciso di utilizzare la GP nei propri programmi di miglioramento genetico del pioppo, in particolare per selezionare piante più resistenti all'afide lanigero e con una migliore qualità del legno.

## La cisgenesi e il genome editing in pioppo

La disponibilità di un genoma sequenziato ha aperto la strada anche alle tecniche di evoluzione assistita (TEA) quali cisgenesi e *genome editing* (GE), con cui è possibile modificare in modo mirato cloni di pioppo di pregio, inserendo caratteri utili per l'adattamento alle condizioni ambientali e la produttività, senza alterare il background genetico e le caratteristiche agronomiche positive.

La cisgenesi consente il trasferimento di geni tra cloni o anche specie diverse, purché sessualmente compatibili, senza l'introduzione di DNA estraneo, realizzando in un tempo relativamente breve un risultato che sarebbe conseguibile attraverso una serie di incroci successivi in programmi pluriennali di miglioramento genetico classico. Dal punto di vista tecnico la cisgenesi si basa sull'utilizzo di vettori di trasformazione *marker-free*, che consentono di eliminare i marcatori molecolari necessari alla selezione delle piante modificate. Ad esempio, è stato possibile incrementare il tasso di accrescimento, inserendo in cloni di pioppo una copia supplementare del gene *GA20ox7* che codifica per un enzima responsabile della biosintesi delle gibberelline, ormoni vegetali che stimolano la crescita (Han et al., 2011): si è dimostrato così che l'introduzione di una copia supplementare di un gene già presente nel genoma ricevente è sufficiente per ottenere un effetto fenotipico. Effetti fenotipici ancora maggiori sono potenzialmente conseguibili con l'utilizzo di alleli superiori dei geni di interesse, la cui individuazione è oggi in corso grazie all'applicazione di tecniche di mappaggio genico avanzate.

Da tempo sono in corso al CREA programmi di ricerca per l'utilizzo di vettori di trasformazione *marker-free* (Zelasco et al., 2007). Recentemente, in prove di cisgenesi condotte nell'ambito del progetto Biotech (<https://www.crea.gov.it/en/-/biotech>) sono state prodotte una serie di linee di pioppo nero (*P. nigra* clone Jean Pourtet) modificate per la produzione di gibberelline, con l'obiettivo di incrementare la crescita e migliorare la resa in biomassa per la produzione di biocarburanti. Per quest'ultimo obiettivo è stato utilizzato il gene *DUF266*, che codifica per un enzima coinvolto nella biosintesi della cellulosa (Yang et al., 2017b).







Camera crescita

La richiesta di biomasse di seconda generazione è prevista in forte aumento nei prossimi anni per soddisfare il fabbisogno di biocarburanti in vista dell'obiettivo di ridurre a zero le emissioni nette di anidride carbonica per il 2050 (IEA, 2022). Piante per la produzione di biomasse fermentabili come il pioppo presentano il vantaggio di poter essere coltivate in modo poco intensivo, anche in terreni marginali, senza sottrarre suolo agrario alle colture alimentari. Il maggiore svantaggio, per contro, è rappresentato **dall'impatto economico ed ambientale dei pretrattamenti chimico-fisici necessari per la separazione della lignina dalla massa fermentabile**. L'approccio cisgenico che prevede l'inserimento del gene *DUF266* risponde a questa limitazione, perché è stato visto che la sovraespressione di questo gene consente di ottenere **biomasse lignocellulosiche, che necessitano di pretrattamenti meno onerosi** (Yang et al., 2017b).



Vivaio di pioppi



Il CREA ha avviato, sempre nell'ambito del progetto Biotech, **esperimenti per la modificazione della composizione del legno anche attraverso GE**. Questa tecnica, che consente di inattivare o modificare in modo mirato specifici geni, è stata utilizzata in pioppo per modificare caratteri relativi a resistenza a **stress biotici e qualità del legno** (Bewg et al., 2018; Anders et al., 2023). Presso il Centro Foreste e Legno (CREA-FL) sono state ottenute numerose linee di pioppo bianco (*P. alba* clone Villafranca) modificate con GE. A tale scopo sono stati scelti i geni *CAD* (Cinnamil-alcol deidrogenasi) e *C3H* (p-cumarato 3-idrossilasi), che codificano per enzimi della via di biosintesi della lignina; inattivando tali geni si sono ottenute piante più adatte alla produzione di biomassa lignocellulosica da avviare alla produzione di biocarburanti. Attualmente, queste linee sono oggetto di studio per la verifica della presenza di modifiche a carico del DNA, con effetto sulla composizione e la quantità della lignina.

## Bibliografia

- Anders, C.; Hoengenaert, L.; Boerjan, W. (2023) Accelerating wood domestication in forest trees through genome editing: Advances and prospects. *Curr. Op. Plant Biol.* 71:102329. Doi: 10.1016/j.pbi.2022.102329.
- Bai, S.; Wu, H.; Zhang, J.; Pan, Z.; Zhao, W.; Li, Z.; Tong, C. (2021) Genome assembly of Salicaceae *Populus deltoides* (eastern cottonwood) i-69 based on nanopore sequencing and hi-c technologies. *J. Hered.* 112:303-310. Doi: 10.1093/jhered/esab010.
- Bergante, S.; Facciotto, G. (2015) Yields of poplars SRC and VSRC grown with different fertilization and irrigation management. *Proceedings of the 23th European Biomass Conference and Exhibition, Vienna, Austria, 1-4 June 2015*; pp. 1-4.
- Bewg, W.P.; Ci, D.; Tsai, C.J. (2018) Genome editing in trees: from multiple repair pathways to long-term stability. *Front. Plant Sci.* 9:1732. Doi: 10.3389/fpls.2018.01732/full.
- Biselli, C.; Vietto, L.; Rosso, L.; Cattivelli, L.; Nervo, G.; Fricano, A. (2022) Advance Breeding for Biotic Stress Resistance in Poplar. *Plants* 11:2032. Doi:10.3390/plants11152032.
- Carletti, G., Carra, A.; Allegro, G.; Vietto, L.; Desiderio, F.; Bagnaresi, P.; Gianinetti, A.; Cattivelli, L.; Valè, G.; Nervo, G. (2016) QTLs for Woolly Poplar aphid (*Phloeomyzus passerinii* L.) resistance detected in an inter-specific *Populus deltoides* x *P. nigra* mapping population. *PLoS ONE*, 11(3). Doi: 10.1371/journal.pone.0152569.
- Faivre-Rampant, P.; Zaina, G.; Jorge, V.; Giacomello, S.; Segura, V.; Scalabrin, S.; Guerin, V.; De Paoli, E.; Aluome, C.; Viger, M.; et al. (2016) New resources for genetic studies in *Populus nigra*: Genome-wide SNP discovery and development of a 12k Infinium array. *Mol. Ecol. Resour.* 16:1023–1036. Doi: 10.1111/1755-0998.12513.
- Geraldes, A.; DiFazio, S.P.; Slavov, G.T.; Ranjan, P.; Muchero, W.; Hannemann, J.; Gunter, L.E.; Wymore, A.M.; Grassa, C.J.; Farzaneh, N.; et al. (2013) A 34K SNP genotyping array for *P. trichocarpa*: Design, application to the study of natural populations and transferability to other *Populus* species. *Mol. Ecol. Resour.* 13:306-323. Doi: 10.1111/1755-0998.12056.
- Eckenwalder, J. E. (1996) 'Systematics and evolution of *Populus*', in *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation Part I*.
- Han, K.M.; Dharmawardhana, P.; Arias, R.S.; Ma, C.; Busov, V.; Strauss, S.H. (2011) Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in *Populus*. *Plant Biotechnol. J.* 9(2):162-178. Doi: 10.1111/j.1467-7652.2010.00537.x.
- Huang, X.; Chen, S.; Peng, X.; Bae, E.K.; Dai, X.; Liu, G.; Qu, G.; Ko, J.H.; Lee, H.; Chen, S.; et al. (2021) An improved draft genome sequence of hybrid *Populus alba* x *Populus glandulosa*. *J. For. Res.* 32:1663-1672. Doi: 10.1007/s11676-020-01235-2.
- IEA, International Energy Agency. Renewables 2022: Analysis and forecast to 2027.

- Lin, Y.C.; Wang, J.; Delhomme, N.; Schiffthaler, B.; Sundstrom, G.; Zuccolo, A.; Nystedt, B.; Hvidsten, T.R.; de la Torre, A.; Cossu, R.M.; et al. (2018) Functional and evolutionary genomic inferences in *Populus* through genome and population sequencing of American and European aspen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:E10970-E10978. Doi: 10.1073/pnas.1801437115.
- Liu, Y.J., Wang, X.R.; Zeng, Q.Y. (2019) De novo assembly of white poplar genome and genetic diversity of white poplar population in Irtysh River basin in China. *Sci. China Life Sci.* 62:609–618. Doi: 10.1007/s11427-018-9455-2.
- Ma, T.; Wang, J.; Zhou, G.; Yue, Z.; Hu, Q.; Che, Y.; Liu, B.; Qiu, Q.; Wnag, Z.; Zhang, J.; et al. (2013) Genomic insights into salt adaptation in a desert poplar. *Nat. Commun.* 4:2797. Doi: 10.1038/ncomms3797.
- Ma, J.; Wa, D.; Duan, B.; Bai, X.; Bai, Q.; Chen, N.; Ma, T. (2019) Genome sequence and genetic transformation of a widely distributed and cultivated poplar. *Plant Biotechnol. J.* 17:451–460. Doi: 10.1111/pbi.12989.
- Pinosio, S.; Giacomello, S.; Faivre-Rampant, P.; Taylor, G.; Jorge, V.; Le Paslier, M.C.; Zaina, G.; Bastien, C.; Cattonaro, F.; Marroni, F.; et al. (2016) Characterization of the Poplar Pan-Genome by Genome-Wide Identification of Structural Variation. *Mol. Biol. Evol.* 33:2706–2719. Doi: 10.1093/molbev/msw161.
- Qiu, D.; Bai, S.; Ma, J.; Zhang, L.; Shao, F.; Zhang, K.; Yang, Y.; Sun, T.; Huang, J.; Zhou, Y.; et al. (2019) The genome of *Populus alba* x *Populus tremula* var. *glandulosa* clone 84K. *DNA Res.* 26:423–431. Doi: 10.1093/dnares/dsz020.
- Scaglione, D.; Pinosio, S.; Marroni, F.; Centa, E.; Di Fornasiero, A.; Magris, G.; Scalabrin, S.; Cattonaro, F.; Taylor, G.; Morgante, M. (2019) Single primer enrichment technology as a tool for massive genotyping: A benchmark on black poplar and maize. *Ann. Bot.* 124:543–551. Doi: 10.1093/aob/mcz054.
- Schilling, M.P.; Wolf, P.G.; Duffy, A.M.; Rai, H.S.; Rowe, C.A.; Richardson, B.A.; Mock, K.E. (2014) Genotyping-by-sequencing for *Populus* population genomics: An assessment of genome sampling patterns and filtering approaches. *PLoS ONE* 9:e95292. Doi: 10.1371/journal.pone.0095292.
- Tuskan, G.A.; DiFazio, S.; Jansson, S.; Bohlmann, J.; Grigoriev, L.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Ralph, S.; Rombauts, S.; Salamov, A.; et al. (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793): 1596–1604. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/313/5793/1596.abstract>.
- Wu, H.; Yao, D.; Chen, Y.; Yang, W.; Zhao, W.; Gao, H.; Tong, C. (2020) De novo genome assembly of *Populus simonii* further supports that *Populus simonii* and *Populus trichocarpa* belong to different sections. *G3 Genes Genom. Genet.* 10:455–466. Doi: 10.1534/g3.119.400913.
- Yang, W.; Wang, K.; Zhang, J.; Ma, J.; Liu, J.; Ma, T. (2017a) The draft genome sequence of a desert tree *Populus pruinosa*. *GigaScience* 6:2797. Doi: [10.1093/gigascience/gix075](https://doi.org/10.1093/gigascience/gix075).
- Yang, Y.; Yoo, C. G.; Guo, H. B.; Rottmann, W.; Winkeler, K. A.; Collins, C. M.; Gunter, L.E.; Jawdy, S.S.; Yang, X.; Guo, H.; Pu, Y.; Ragauskas, A.J.; Tuskan, G.A.; Chen, J. G. (2017b). Overexpression of a Domain of Unknown Function 266-containing protein results in high cellulose content, reduced recalcitrance, and enhanced plant growth in the bioenergy crop *Populus*. *Biotechnol. Biofuels*, 10, 1–13. DOI <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0760-x>.
- Zelasco, S.; Ressegotti, V.; Confalonieri, M.; Carbonera, D.; Calligari, P.; Bonadei, M.; ... & Balestrazzi, A. (2007) Evaluation of MAT-vector system in white poplar (*Populus alba* L.) and production of ipt marker-free transgenic plants by 'single-step transformation'. *Plant cell tissue organ cult.* 91:61–72. Doi: 10.1007/s11240-007-9278-4.
- Zhang, Z.; Chen, Y.; Zhang, J.; Ma, X.; Li, Y.; Li, M.; Wang, D.; Kang, M.; Wu, H.; Yang, Y.; et al. (2020) Improved genome assembly provides new insights into genome evolution in a desert poplar (*Populus euphratica*). *Mol. Ecol. Re-sour.* 20:781–794. Doi: 10.1111/1755-0998.13142.

# Animali: tutta un'altra cosa

Di Crisà / Marchitelli



Nel 1996 la pecora Dolly ha aperto la strada alla clonazione animale da cellule somatiche, eppure ad oggi è stato commercializzato un solo animale geneticamente modificato a scopo alimentare, il salmone AquAdvantage a crescita rapida, mentre pochi altri animali GM vengono utilizzati per testare la funzione e la regolazione dei geni.

A livello nazionale la metodologia dell'editing genomico è stata utilizzata per lo studio, a scopo di ricerca, di una malattia neurodegenerativa nei suini e per l'eliminazione di molecole antigeniche presenti nei prodotti di origine animale sia in suini che nei bovini.

Il gruppo di ricerca del CREA- Zootecnia e Acquacoltura spiega le ragioni di natura tecnica, normativa, economica ed etica connesse con i lenti progressi in questo ambito.

Lo sviluppo e l'utilizzo di nuove tecniche genomiche (NTG, come definite dalla [Commissione Europea](#)) potrebbe essere uno strumento molto potente per contribuire alla trasformazione globale degli allevamenti, poiché tale tecnologia è in grado di accorciare significativamente il ciclo di allevamento, ridurre i costi e aumentare rapidamente la diversità genetica.

I sistemi di editing genomico consentono di introdurre modificazioni genetiche, ma, a differenza di tecnologie già esistenti, non comportano necessariamente l'introduzione di sequenze di DNA in nuove posizioni del genoma; in pratica si interviene direttamente sul gene già presente introducendo, a seconda dei casi, mutazioni casuali o mirate per ottenere gli effetti desiderati, sfruttando i meccanismi naturali di riparazione dei danni del DNA.



## Quali sono le nuove tecniche genomiche nell'ambito zootecnico e come vengono utilizzate?

Le più recenti tecnologie, utilizzate anche nei processi di manipolazione del genoma, sono preferenzialmente tre: **TALEN** (Transcription activator-like effector nucleases), **ZFN** (Zinc-finger nucleases) e **CRISP/Cas9** (CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-associated protein 9). In tutti questi sistemi, ad una proteina che è in grado di introdurre tagli nel DNA (forbice molecolare), viene associato un "selettore" molecolare, capace di indicare alla nucleasi dove tagliare e di introdurre i cambiamenti in una specifica sequenza.

Sono stati già prodotti diversi animali d'allevamento con la tecnica dell'editing genomico, a scopo di ricerca, sia in campo biomedico che in agricoltura.

A **livello mondiale**, tra gli **animali modificati a scopi produttivi** risultano i seguenti: **suini** resistenti al virus della sindrome riproduttiva e respiratoria (gene *CD163*); **bovini, pecore, capre, polli** con una maggiore muscolatura (gene *MSTM*), pecore che producono più lana (gene *FGF5*); suini in cui viene soppresso lo sviluppo del testicolo nelle creste gonadiche fetali, con conseguente sviluppo dei caratteri femminili e perdita del forte odore del verro (gene *KISS1*); **galline ovaiole, in cui si riesce a determinare il sesso delle uova**, grazie all'introduzione di una proteina fluorescente sul cromosoma Z (determina il sesso maschile) delle cellule germinali. Le **vacche che nascono senza corna** (gene *POLLED*) sono un esempio di sostituzione intraspecie di uno dei due alleli del gene, mentre le vacche con una maggiore resistenza alla tubercolosi (gene *NRAMP1*) rappresentano il risultato di inserzione di un gene intraspecie (la cis-genesi). Complessivamente le modificazioni ottenute in animali di allevamento di cui si hanno riferimenti bibliografici sono circa quaranta.

A **livello nazionale** la metodologia dell'editing genomico è stata utilizzata per lo studio, a scopo di ricerca, di una **malattia neurodegenerativa nei suini** (gene *SURF1*) e per **l'eliminazione di molecole antigeniche presenti nei prodotti di origine animale sia in suini che nei bovini** (geni *GGTA1* e *CMAH*).

## Cosa limita l'utilizzo dell'editing genomico negli animali?

L'utilizzo dell'editing nel miglioramento genetico è attualmente limitato da due principali ordini di considerazioni: da un lato, è necessario conoscere i geni che devono essere oggetto della modificazione e che controllano le caratteristiche zootecniche che si intende migliorare; dall'altro, l'incertezza normativa che ancora permane non consente di chiarire se, per l'editing del genoma, si debba applicare la normativa esistente per gli organismi geneticamente modificati (OGM).

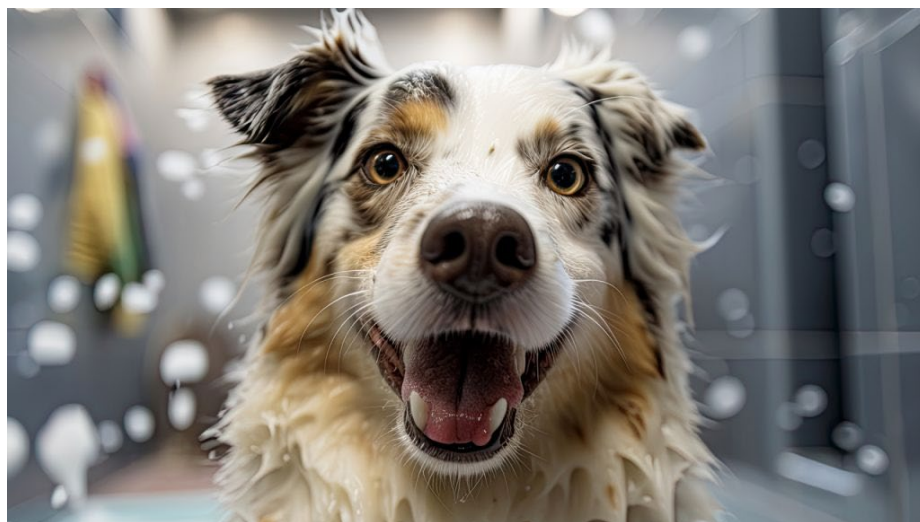
**Non esiste un consenso tra le agenzie di regolamentazione a livello mondiale e la mancanza di armonizzazione ha portato a importanti differenze tra i Paesi.** L'Unione Europea definisce OGM un organismo in cui il materiale genetico (DNA/RNA) sia stato alterato in un modo che non avviene solitamente mediante accoppiamento e/o ricombinazione naturale [European Council, (1990), (EU Directive No 2001/18/EC)]. Attualmente, nell'UE, gli OGM devono essere sottoposti a una valutazione della sicurezza, secondo le disposizioni previste dalla legislazione, prima di essere autorizzati al consumo umano. La valutazione scientifica del rischio è delegata all'EFSA, che fornisce pareri scientifici sulla base di dossier dettagliati. Una valutazione effettuata nel 2021, ha chiarito che gli organismi ottenuti attraverso nuove tecniche genomiche sono soggetti alla legislazione sugli OGM.

Per le piante il discorso sembrerebbe più facile: una recente valutazione dell'EFSA ha concluso che le tecniche di "editing del genoma" delle piante non comportano maggiori rischi rispetto al breeding convenzionale o alle tecniche di mutagenesi e cisgenesi mirate.

**In campo animale c'è ancora incertezza normativa.** Infatti, mentre le colture vegetali geneticamente modificate sono commercializzate da oltre 22 anni, solo nel 1996 la pecora *Dolly* ha aperto la strada alla clonazione animale da cellule somatiche. Ad oggi un solo animale geneticamente modificato a scopo alimentare, il salmone **AquAdvantage** a crescita rapida, è stato commercializzato e pochi altri animali GM vengono utilizzati per testare la funzione e la regolazione dei geni (al di fuori degli studi sugli xenotrapianti).

**Alcuni paesi applicano un criterio ragionevole secondo cui, se non esiste una "nuova combinazione di materiale genetico" e il prodotto finale è privo di "transgeni", allora quel prodotto non sarà soggetto alla stessa regolamentazione di un OGM.** Gli Stati Uniti applicano questo principio per l'editing del genoma nelle piante, tuttavia, sempre negli USA il criterio è l'esatto opposto per gli animali, soggetti a regolamenti stabiliti per gli animali transgenici: sono trattati, cioè, ai sensi del sistema di regolamentazione dei farmaci, lo stesso che, in sostanza, sta chiudendo la ricerca e l'applicazione futura di questa tecnologia.

D'altra parte, molti paesi in Sud America (tra cui Argentina e Brasile), Asia Orientale (si pensi al Giappone), Medio Oriente (ad esempio, Israele) e Oceania (ad esempio, Australia) hanno regolamentazioni più appropriate in base al tipo di evento da valutare. **La Cina non ha definito uno status normativo specifico per i prodotti di modifica del genoma, ma vanta il numero più alto di pubblicazioni di ricerca e brevetti per applicazioni agricole del CRISPR.**



## Editing genomico ed Etica

L'inarrestabile progresso di CRISPR/CAS9 e la sua adozione non sono esenti da problemi di ordine pratico, economico ed etico. Dal punto di vista tecnologico, non si è ancora giunti all'assoluta precisione, per cui il rischio di creare modifiche non volute, che potrebbero comportarsi potenzialmente da mutazioni, è reale. Dal punto di vista economico, esiste una "guerra dei brevetti" tra gli istituti pionieri nello sviluppo della tecnologia CRISPR/CAS9 a causa degli interessi in gioco e delle inestimabili possibilità di guadagno. Un'altra partita importantissima è quella che si gioca a livello etico. **Le metodologie di ingegneria genetica applicate agli animali da allevamento sono molto diverse rispetto a quelle utilizzate per le piante perché queste ultime possono rigenerarsi dalle cellule somatiche, mentre gli animali possono svilupparsi solo dalle cellule germinali. L'uso a scopo di ricerca degli embrioni solleva problemi etici e di benessere nei vertebrati, poiché in un esperimento di ingegneria genetica (compreso l'editing genomico) sono necessari molti embrioni; quelli trasformati con la modifica desiderata e nessun apparente effetto indesiderato sono selezionati per l'impianto; ulteriori embrioni vengono persi durante la fecondazione e la gravidanza.**

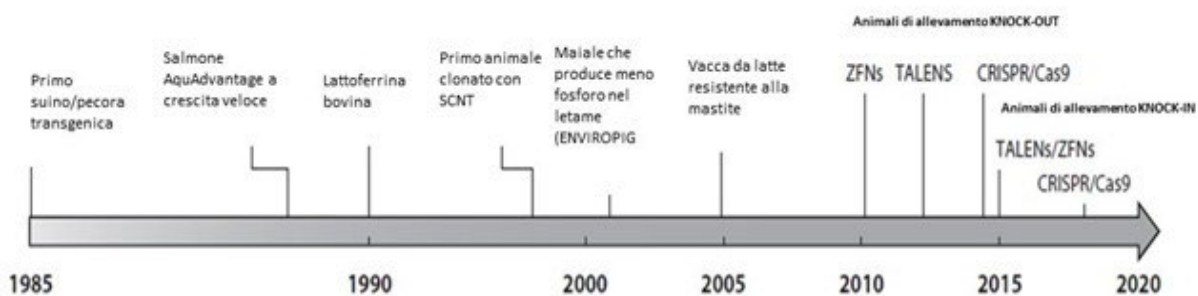
**I due metodi principali per ottenere animali geneticamente ingegnerizzati sono il trasferimento nucleare di cellule somatiche (clonaggio) e l'iniezione citoplasmatica (iniezione pronucleare o microiniezione).**

Con la clonazione, cellule primarie di un animale adulto (ad es. fibroblasti) vengono ottenute in coltura cellulare e poi trasfettate con componenti CRISPR/CAS9 (ad es. trasfezione virale o elettroporazione). Dopo la selezione delle alterazioni del DNA desiderate, il nucleo della cellula somatica è fuso con una cellula uovo enucleata per creare un embrione vitale e contenente il genoma modificato.

La microiniezione, invece, comporta l'iniezione diretta del complesso per l'editing del genoma nel citoplasma di uno zigote. Tuttavia, la microiniezione ha basse efficienze di editing e comunemente si traduce in mosaicism (una miscela di alleli modificati e non). A causa delle difficoltà che la microiniezione comporta, i metodi di clonazione sono ancora ampiamente utilizzati e comunque possono portare a difetti alla nascita, aborti e morte postnatale precoce. Pertanto, in particolare per i vertebrati animali, gli esperimenti di modifica del genoma comportano problematiche etiche e di benessere.

Presso le aziende sperimentali del CREA non sono ancora state sviluppate ricerche relative all'utilizzo delle metodologie dell'editing genomico sugli animali da allevamento, anche per le problematiche menzionate.

Per ottenere un animale "editato a livello genetico" sono necessari investimenti a livello di ricerca di base (laboratorio specialistico, strumentazioni, personale), mentre il CREA, istituzionalmente, affronta le grandi sfide del XXI secolo, con un approccio multidisciplinare e improntato al trasferimento tecnologico dei risultati della ricerca. **Considerando le questioni riguardanti anche la regolamentazione, l'ambito etico e l'eventuale accettazione da parte del consumatore di prodotti di origine animali ottenuti con le nuove tecnologie genomiche, lo sviluppo delle TEA nell'ambito del CREA non è stato finora preso in considerazione.** I pochi esempi di editing genetici a livello nazionale sono stati sviluppati da un'istituzione privata (Avantea).





## La zootecnia in Italia

La zootecnia italiana conta oltre 6 milioni di bovini (di cui circa 1,8 milioni di vacche da latte), più di 9 milioni di suini, oltre 8 milioni tra pecore e capre e circa 150 milioni di polli, attestandosi come settore chiave dell'agricoltura nazionale, con la maggior capacità di generare ricchezza per il Paese. Tra i prodotti zootecnici alimentari, le carni rappresentano più del 60% del valore della produzione zootecnica mentre il latte oltre il 30%. La maggior parte della produzione proviene dal sistema intensivo concentrato nelle quattro regioni settentrionali: Piemonte, Lombardia, Veneto ed Emilia-Romagna.

**A partire dagli anni '70 del secolo scorso si è assistito nel nostro Paese ad una riduzione degli animali allevati, e al contemporaneo aumento della produttività per capo allevato.**

**Come si è riusciti ad ottenere animali più produttivi? Grazie al miglioramento genetico delle razze, al perfezionamento dell'alimentazione, all'adeguamento delle strutture di produzione, alla diffusione di pratiche sanitarie più efficaci, all'automazione e all'affermarsi di modelli di gestione più integrati e funzionali, e allo sviluppo di una zootecnia di precisione.**

**Quali sono le sfide che deve affrontare il settore della zootecnia nel mondo e in Italia?**

In primis c'è la richiesta di aumentare la disponibilità di alimenti di origine animale (carne, latticini, uova) per aiutare a soddisfare le esigenze nutrizionali di una popolazione mondiale in crescita, di circa 9 miliardi di persone nel 2050 secondo le ultime proiezioni delle Nazioni Unite. Allo stesso tempo, i cambiamenti climatici influenzano molto le produzioni zootecniche e minacciano la biodiversità, richiedendo sempre più un approccio "ONE HEALTH", in un'ottica integrata di promozione della salute dell'animale, dell'uomo e dell'ambiente.

## Miglioramento genetico animale: passato-presente e futuro

Il concetto di miglioramento genetico è strettamente legato al fatto che l'uomo fin dai tempi della domesticazione ha voluto migliorare, nelle specie animali, caratteri relativi alla produzione (quantità e qualità), alla velocità di crescita, alla fertilità e resistenza alle malattie, e all'adattabilità dell'animale all'ambiente in cui viene allevato. Il tutto si basava sulla selezione naturale, senza alcuna conoscenza dei meccanismi dell'ereditarietà, scegliendo gli animali migliori e con le caratteristiche desiderate.

**A partire da metà degli anni '50, con la scoperta del DNA – materiale alla base della trasmissione dei caratteri tra le generazioni – per la selezione degli animali si è assistito ad un processo esponenziale che ha portato prima alla selezione genetica e poi a quella genomica.** Sono stati sviluppati dei complessi calcoli statistici, che utilizzano enormi quantità di dati fenotipici (il carattere che osserviamo e che vogliamo migliorare) e genotipici (non un solo gene, ma l'intero genoma). Così il miglioramento genetico basato sulla selezione genomica è diventato sempre più preciso, e si è ridotto notevolmente il tempo necessario per ottenere il progresso genetico.

Cosa ci attende nel futuro? L'editing genetico, oggetto del presente articolo, rappresenta uno degli ultimi progressi lungo il *continuum* che tende a migliorare la precisione del processo di selezione.

## TEA in pratica: l'innovazione multi-attore della PAC

Di Cristiano / Carta / Bonfiglio



Quali impatti e ricadute socio-economici potrebbero avere le TEA? Innegabilmente la modernizzazione e la crescita della competitività del settore agricolo, anche in risposta alle strategie europee della Farm to Fork e del Green Deal. Gruppi Operativi del Partenariato Europeo per l'Innovazione in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura hanno realizzato innovazioni basate sullo sviluppo di tecniche di evoluzione controllata tradizionali per il miglioramento genetico in agricoltura. Scopriamo quali.

**Le potenzialità delle TEA di produrre impatti socio-economici rilevanti, soprattutto, per il conseguimento degli obiettivi della PAC** e, in particolare, delle strategie europee della Farm to Fork e del Green Deal, sono ormai ampiamente sostenute da diversi portatori d'interesse in Europa e riguardano, in particolare, **la modernizzazione e la crescita della competitività del settore agricolo**, attraverso:

- l'incremento della produttività relativa alle maggiori rese delle piante, in conseguenza della loro maggiore tolleranza e della resistenza agli stress biotici e abiotici;
- l'aumento del valore aggiunto delle produzioni correlato alla migliore qualità delle piante e ridotto contenuto di sostanze nocive (es. allergeni, sostanze chimiche, contaminanti e tossine);

- la riduzione dei costi di produzione come conseguenza del minor uso di prodotti fitosanitari e fertilizzanti e dell'uso di altri input;
- l'aumento della disponibilità, accessibilità e diversità di cibo a più alto valore nutrizionale.

A questo proposito, è interessante notare una certa convergenza tra le aree di innovazione delle TEA e quelle di una rilevante numerosità di Gruppi Operativi sostenuti dalla programmazione PAC 2014-2023, che hanno realizzato **innovazioni** basate sullo sviluppo di tecniche di evoluzione controllata (TEC) tradizionali per il miglioramento genetico in agricoltura.



## Gruppi Operativi (GO) del Partenariato Europeo per l'Innovazione in materia di produttività e sostenibilità dell'agricoltura (PEI AGRI)

I GO del PEI AGRI sono partenariati multi-attore che riuniscono imprenditori agricoli e forestali, mondo della ricerca, consulenti, servizi di supporto all'innovazione e altri attori rilevanti, col fine di cooperare per la realizzazione di innovazioni risolutive di specifici problemi e opportunità di sviluppo delle imprese agricole e forestali o di sistemi rurali.

Si tratta di tecniche di ibridazione e selezione di specie e varietà, che discendono da mutazioni spontanee, e anche tecniche di laboratorio, come la mutagenesi chimica, la sanificazione e i trattamenti termici per l'inattivazione virale e l'uso di seme sessato per accrescere la numerosità di vitelli di sesso femminile.

In termini numerici, su 682 GO (Dati banca dati innovarurale al 16 maggio 2023), circa il 17% sono GO-TEC (113 GO che hanno adottato le TEC) e realizzano progetti di dimensioni economiche che ammontano, in totale, al 17% dei budget dei GO e, in media, a circa 361 mila €, contro una media complessiva leggermente inferiore di 343 mila €.



I **GO-TEC**, proprio per la natura e le finalità delle innovazioni introdotte, affrontano principalmente **problematiche legate all'aumento della biodiversità (27%** dei GO), cui seguono temi riconducibili allo sviluppo dell'**agricoltura biologica (13%)**, alla **difesa da malattie e infestazioni (12%)** e alla **valorizzazione dei prodotti** all'interno delle filiere agroalimentari **(12%)** (Tabella 1). Anche rispetto al totale dei GO, si nota come una quota significativa dei GO che perseguono obiettivi connessi alla biodiversità adottò le TEC, a dimostrazione quindi della **finalità principale di queste innovazioni**, ossia quella di **favorire la variabilità genetica**.

Tematica	GO-TEC	%	GO totali*	% su GO totali
Biodiversità	31	27,4	52	59,6
Agricoltura biologica	15	13,3	58	25,9
Difesa da malattie e infestazioni	14	12,4	67	20,9
Filiere agroalimentari	14	12,4	48	29,2
Mercato e sicurezza alimentare	7	6,2	34	20,6
Prodotti di qualità	7	6,2	20	35
Gestione aziendale	6	5,3	84	7,1
Diversificazione e <u>multisetorialità</u>	4	3,5	16	25
Mercati locali e filiere corte	4	3,5	20	20
Gestione dei sottoprodotti agricoli	3	2,7	44	6,8
Agricoltura di precisione	2	1,8	64	3,1
Agricoltura in vivaio	1	0,9	2	50
Giovani e ricambio generazionale	1	0,9	1	100
Impronta carbonica	1	0,9	20	5
Logistica	1	0,9	5	20
Marchi e certificazioni	1	0,9	14	7,1
Uso del suolo	1	0,9	14	7,1
<b>Totale</b>	<b>113</b>	<b>100</b>	<b>682</b>	<b>16,6</b>

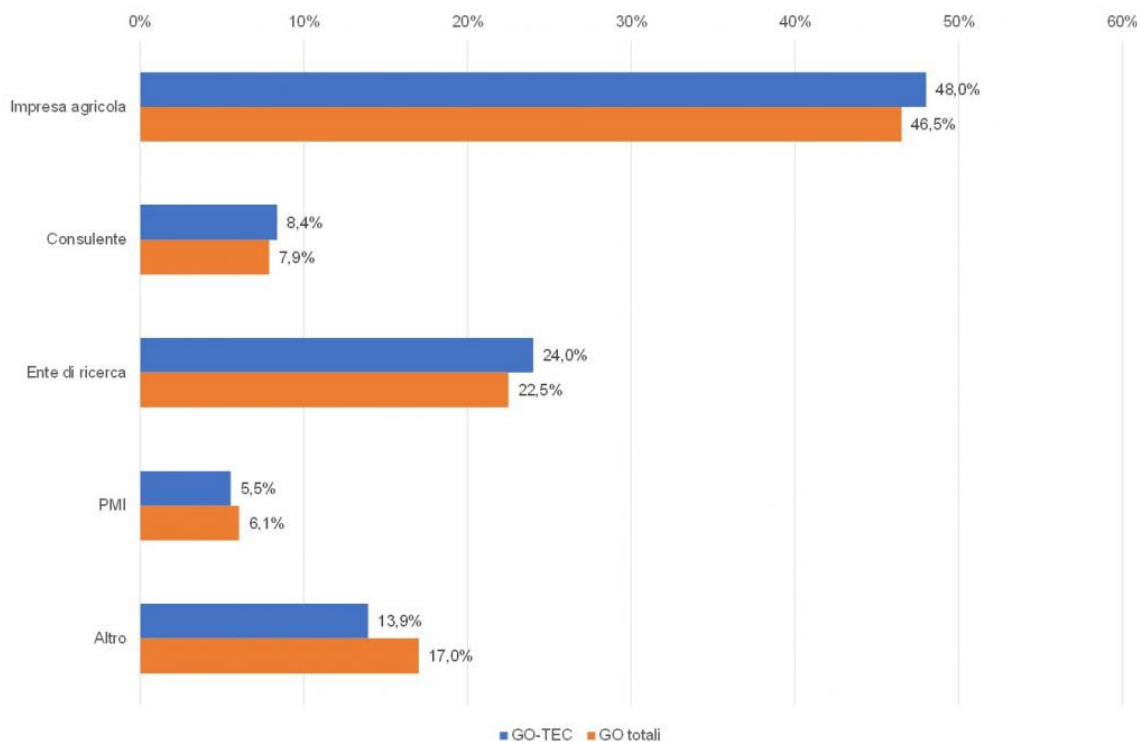
**Tabella 1** – GO-TEC per tematica prevalente

Dal punto di vista settoriale, le TEC risultano prevalentemente applicate nel **comparto cerealicolo (23%)**; mentre, nei comparti relativi a viticoltura, frutticoltura e coltivazioni industriali presentano percentuali superiori o intorno al 10%. Frequente è anche l'uso trasversale delle TEC in più comparti (11%) (Tabella 2).

Comparto	GO-TEC	%	GO totali*	% su GO totali
Cerealicoltura	26	23	56	46,4
Viticultura	13	11,5	92	14,1
Frutticoltura	12	10,6	68	17,6
<u>Multifiliera</u>	12	10,6	139	8,6
Colture industriali	11	9,7	32	34,4
Orticoltura	10	8,8	62	16,1
Zootecnia - bovini/bufalini	9	8	58	15,5
Florovivaismo	6	5,3	13	46,2
Apicoltura	3	2,7	4	75
Coltivazioni foraggere	3	2,7	10	30
Olivicoltura	3	2,7	24	12,5
Zootecnia - ovi-caprini	3	2,7	10	30
Zootecnia - suini	2	1,8	26	7,7
<b>Totale</b>	<b>113</b>	<b>100</b>	<b>682</b>	<b>16,6</b>

**Tabella 2** – GO-TEC per comparto prevalente

Dal punto di vista della composizione, i GO-TEC sono costituiti mediamente da 8 partner (Figura 1), in linea con la media complessiva, mentre, rispetto agli altri GO, vedono una presenza più marcata di imprese agricole e, a seguire, di enti di ricerca e consulenti.



**Figura 1** – Tipologia di partner nei GO-TEC e confronto con tutti i GO

L'analisi di questi dati evidenzia come, qualora il necessario quadro regolatorio di riferimento per le TEA fosse definito dalla CE, come previsto entro il 2023 (*European Commission (2022) Commission work programme 2023: A Union standing firm and united. URL: [https://commission.europa.eu/system/files/2022-10/com\\_2022\\_548\\_3\\_en.pdf](https://commission.europa.eu/system/files/2022-10/com_2022_548_3_en.pdf)*), consentendone la sperimentazione in campo, i **GO del PEI-Agri potrebbero rappresentare un'efficace strumento di ulteriore sviluppo di tali tecnologie, che ne esalterebbe il carattere innovativo e le capacità di intervenire in maniera puntuale e tempestiva sulle opportunità di innovazione dei sistemi agricoli territoriali**, in particolare, attraverso:

- la realizzazione di **percorsi di ricerca e innovazione TEA responsabili** – RIR che, ispirati dall'approccio multi-attore e del modello interattivo di innovazione del PEI-Agri, potrebbero essere più impattanti, in quanto basati sui fabbisogni e sulle opportunità reali del mondo produttivo, oltre che sul confronto più sistematico con la pluralità degli attori interessati dai loro risultati;
- la realizzazione di **soluzioni TEA più accurate e rapide in risposta a opportunità di sviluppo aziendale** che affrontino le attuali sfide e siano più aderenti agli obiettivi della PAC (es. definizione di protocolli produttivi sicuri per i consumatori e tracciabili; mantenimento della biodiversità locale; compatibilità con sistemi produttivi specifici come il biologico);
- la costruzione di **serie di dati di investimento, realizzazione e impatto** che, obbligatoria nel contesto della PAC, potrà contribuire a dare evidenza sui risultati delle TEA a livello aziendale e nei diversi sistemi agricoli;
- **la crescita di una maggiore conoscenza e consapevolezza** sulle TEA, diffusa nei vari territori e basata sulla condivisione dei diversi saperi locali e sull'esperienza della loro reale implementazione nei diversi sistemi produttivi territoriali.

## Bibliografia

Commissione Europea, 2021 Commission [Staff Working Document – Study on the status of new genomic techniques under Union law and in light of the Court of Justice ruling in Case C-528/16 SWD\(2021\) 92](#)

Commissione Europea (2013).“[Options for Strengthening Responsible Research and Innovation – Report of the Expert Group on the State of Art in Europe on Responsible Research and Innovation](#)”. Publications Office. doi:[10.2777/46253](#)

FAO. 2022. Gene editing and agrifood systems. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3579en>

Hingsamer M., Kulmer V., de Roode M. and Kernitzkyi M. (2022), Environmental and socio-economic impacts of new plant breeding technologies: A case study of root chicoy for inulin production. *Front. Genome Ed.* 4:919392. doi:[10.3389/fgeed.2022.919392](#).

Noleppa S., Carlsburg M. (2021) The socio-economic and environmental values of plant breeding in the EU and selected EU member states. An ex-post evaluation and ex-ante assessment considering. Berlin, May 2021 HFFA Research GmbH.

Owen, Richard; Macnaghten, Phil; Stilgoe, Jack (2012). “Responsible research and innovation: from science in society to science for society, with society”. *Science and Public Policy*. 39(6): 751–760. doi:[10.1093/scipol/scs093](#).



# UNO SGUARDO AL FUTURO

## Non c'è futuro senza ricerca (... e sperimentazione in campo)

Di D'Orso / Palma / Possenti



Scienza e innovazione sono fondamentali per la tutela del pianeta e per coniugare sviluppo economico-sociale e sostenibilità ambientale, valorizzando al tempo stesso le eccellenze del nostro patrimonio agroalimentare. In questo quadro è fondamentale il contributo che le TEA possono offrire: la ricerca già lo sa. Bisogna intraprendere un percorso che preveda un adeguamento legislativo, basato sulle evidenze scientifiche, che permetta la sperimentazione in campo sulle piante generate tramite TEA per portare i prodotti migliorati sul mercato.

**L'applicazione delle TEA (Tecnologie di Evoluzione Assistita) nell'ambito della ricerca è già una realtà, ma la vera prospettiva futura è quella di vedere in campo e sul mercato i nuovi genotipi più resistenti a malattie, resilienti ai cambiamenti climatici o con caratteristiche qualitative migliorate sia in termini nutrizionali che merceologici, il tutto a vantaggio dell'agricoltura, dell'ambiente e del consumatore.** L'innovazione tecnologica e la diversificazione varietale sono necessarie per far fronte alle richieste dei mercati e dei consumatori, che cambiano nel tempo, ad esempio per fascia di età o per tipologia di dieta. 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.

Tuttavia, **l'attuale quadro normativo italiano relega di fatto l'impiego di queste agro-biotecnologie alle sole attività di laboratorio, senza nemmeno la possibilità di sperimentazione in campo.** A chiedere però un cambiamento non sono solo i ricercatori, ma anche le associazioni di categoria che hanno compreso come queste metodiche di precisione possano essere determinanti per affrontare le sfide dell'agricoltura di oggi e di domani e su come il loro utilizzo possa consentire di raccogliere la sfida aperta dall'UE per un sistema agroalimentare salubre e resiliente.

In particolare, bisogna intraprendere un percorso scevro da conflitti ideologici ed interessi di parte che sia in grado di costruire un futuro in cui ci sia un adeguamento legislativo basato sulle evidenze scientifiche che permetta la sperimentazione in campo sulle piante generate tramite TEA al fine di portare i prodotti migliorati sul mercato. **Occorrono regole chiare, che rendano più semplice la creazione di un contesto nel quale l'innovazione possa svilupparsi liberamente. In parallelo è importante un investimento strutturale nella ricerca in campo vegetale, finalizzata all'implementazione tecnologica e all'acquisizione di know-how sulle metodiche del genome editing, in continuo aggiornamento per lo sviluppo di strumenti molecolari sempre più innovativi, precisi ed efficaci. E, soprattutto, occorre un investimento nella ricerca fondamentale: da una parte, per la comprensione della funzione dei geni, di come questi sono strutturati e regolati, in particolare in risposta alle condizioni ambientali, dall'altra, invece, per lo studio della biodiversità agricola di cui è ricco il nostro Paese.** Queste attività sono necessarie per la progettazione di nuove varietà da ottenere mediante TEA, al fine di ottenere piante che possano garantire produttività, salubrità e sostenibilità delle coltivazioni, soprattutto alla luce delle mutevoli condizioni climatiche che già oggi sono evidenti nel nostro Paese.

In assenza di un vero cambio di passo nella legislazione e nell'investimento sull'attività di ricerca in questo campo, **si rischia di rimanere indietro rispetto ad altri Paesi, soprattutto extra-europei, che già oggi stanno sperimentando e commercializzando i prodotti derivati dalle TEA.** L'Italia deve diventare un riferimento internazionale per queste biotecnologie, avendo già oggi a disposizione nel settore pubblico competenze e strutture. I prodotti vegetali, che verrebbero prodotti con le TEA non sono affatto una minaccia per le varietà tradizionali, ma le affiancherebbero per potenziare i prodotti del Made in Italy, molti dei quali già 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.

# CHIEDILO AL CREA

## Federica: i prodotti ottenuti con le TEA sono uguali ai prodotti ottenuti “tradizionalmente”?

**Che contributo possono dare sotto il profilo delle proprietà nutrizionali e della sicurezza alimentare?**

**Risponde Marina Carcea** Dirigente  
Tecnologo CREA Alimenti e Nutrizione

Le biomasse sono “massa” – cioè “peso” presente nell’organismo vivente – costituita prevalentemente da composti del carbonio, derivanti dal processo di fotosintesi clorofilliana, ossia il processo biochimico vitale per la pianta, che permette ai vegetali di produrre composti organici (zuccheri e carboidrati e, quindi, nutrienti) a partire da materia inorganica (la CO<sub>2</sub>, l’acqua) e usando l’energia della luce del sole. Prodotto “secondario” di tutto rispetto dell’intero processo è l’ossigeno, emesso dalle piante in atmosfera, ed essenziale per la vita sulla Terra. Ed è sempre da qui, dalla fotosintesi, che derivano tutte le biomasse: in primis quelle vegetali e successivamente anche quelle animali, che vengono utilizzate dall’uomo, ormai da millenni, per diversi impieghi.



Considerate spesso come materiale di scarto, le biomasse in realtà rappresentano una risorsa essenziale nella produzione di energia, soprattutto in un’ottica di sostenibilità. Esse, infatti, contengono ancora moltissima energia chimica potenzialmente utilizzabile, nei prodotti carboniosi, destinati alla fine del loro ciclo a tornare ad essere CO<sub>2</sub>, cioè carbonio inorganico, che viene quindi, nuovamente rilasciato in atmosfera. Durante le diverse fasi di questo processo, l’uomo può intervenire, sfruttando proprio quel contenuto di energia presente nelle biomasse, ancor prima che queste tornino ad essere CO<sub>2</sub>, producendo ad esempio il biometano attraverso l’utilizzo di digestori. L’importanza dal punto di vista ambientale è tale che il bilancio carbonico, nel caso che le biomasse vengano utilizzate per produrre energia, è pressoché pari a zero: tanta CO<sub>2</sub> viene trasformata in carbonio organico nelle biomasse, tanta ne viene rilasciata dopo lo sfruttamento energetico. Se parte di queste biomasse torna poi al terreno come sostanza organica, il bilancio è negativo, cioè si immagazzina per molti anni CO<sub>2</sub> nel suolo, con un vantaggio in termini di impronta carbonica.

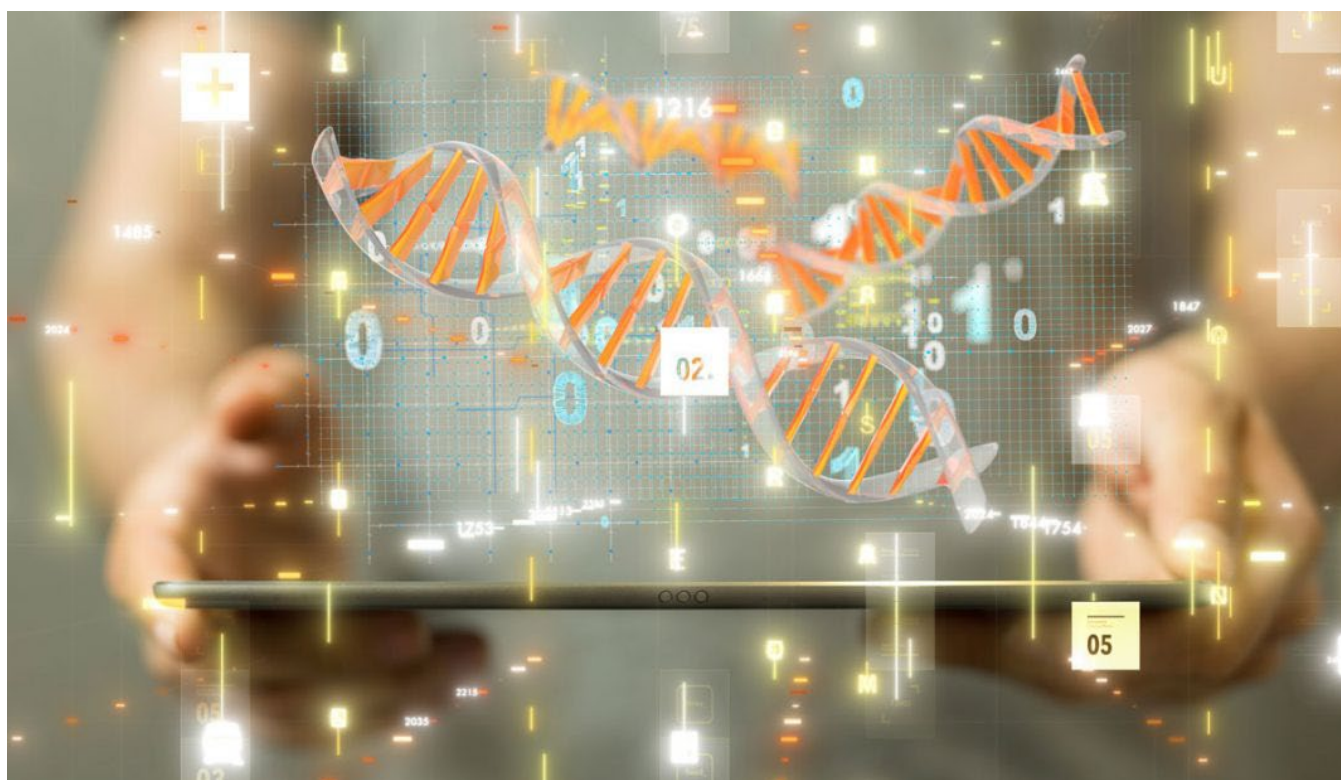
Inoltre, esse racchiudono un potenziale veramente significativo in termini di economia circolare, che le rende essenziali nella produzione di energia. Basti pensare, per esempio, ad un vigneto: le vinacce, biomasse di scarto prodotte in ambito agro-industriale, possono da una parte dar vita al biometano, dall’altra al cosiddetto digestato (il residuo della biomassa, cioè, presente nel digestore dopo la produzione ad opera dei batteri del biometano), che può essere impiegato a sua volta per rifertilizzare quello stesso vigneto che le ha prodotte. E così via...



# DAL CREA CON SENTIMENT(O)

## TEA (tecnologie di evoluzione assistita) & Co: un'analisi del sentimento nei media

di Vassallo / Gabrieli



Tema di grande attualità, al centro del dibattito scientifico e politico, che, pur toccando vari ambiti dell'agroalimentare e dell'agricoltura in generale, resta ancora però un argomento per addetti ai lavori, mentre tutti gli altri lo guardano con prudenza e, addirittura, perplessità, dovuta anche ad una strisciante e crescente disinformazione. Scopriamone di più insieme ai nostri esperti di sentiment analysis, Marco Vassallo e Giuliano Gabrieli (Ufficio di Statistica del CREA Politiche e Bioeconomia).

L'analisi proposta per questo numero cerca di approfondire il contenuto e il sentimento dei testi pubblicati su *Twitter* da parte di alcuni media italiani sull'applicazione delle Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) al settore agricolo nel periodo che intercorre dal 1° gennaio al 15 maggio 2023.

Oggi, l'agricoltura si trova davanti alla difficoltà di fronteggiare problemi legati al cambiamento climatico e alla crescente siccità che interessa l'intero pianeta e colpisce la produzione delle colture. Inoltre, il *Green Deal* europeo, tra i suoi obiettivi, richiede una forte diminuzione nell'utilizzo di fitofarmaci e fertilizzanti. In tale contesto si collocano le TEA che, in Italia, grazie anche al progetto BIOTECH (progetto nazionale sul miglioramento genetico vegetale, coordinato dal CREA e finanziato dal Ministero dell'Agricoltura, della Sovranità Alimentare e delle foreste) propone l'implementazione del *genome editing* e della *cisgenesis* per raggiungere il

miglioramento genetico delle principali colture italiane, in termini sia di adattamento delle piante ai cambiamenti climatici sia di compatibilità con la sostenibilità ambientale.

Essendo la tematica molto specifica e complessa per la raccolta dei *tweet* si è deciso di considerare due tipologie di media, generalisti e specializzati (Sono stati considerati 68 *account Twitter* riferibili a media considerati "generalisti" – ovvero media di giornali, televisioni e radio che si propongono quale mezzo di comunicazione per un pubblico di massa trattando argomenti di vario genere – e 35 riferibili a media considerati "specializzati" – ossia, maggiormente esperti del settore). Inoltre, essendo anche la tematica molto delicata si è deciso di valutare anche un potenziale impatto di sentimento in altri due campioni di *account* su *Twitter*, uno costituito dalle parti sociali (13 *account* di organizzazioni di categoria che hanno parlato della tematica TEA) e un altro dagli utenti generici della rete (La raccolta dei *tweet* degli utenti della rete è iniziata a partire dal 27-04-2023. Essendo un campione per sua natura molto numeroso e che contiene informazioni molto variegata si è ritenuto necessario restringere il periodo temporale di raccolta e selezionare quegli *account* che parlavano della tematica TEA, per un totale di 8523), ossia il punto di vista di operatori del settore socio-politico e dei cittadini.

In tabella 1 sono riportati il numero di *account* per tipologia insieme al numero di *tweet* trovati, secondo delle chiavi ricerca impostate per individuare la tematica e il suo impatto in agricoltura.

TIPO UTENTE	CAMPIONE							
	ACCOUNT				TWEET			
	TOTALI	FREQ (%)	TEMATICA "TEA"	FREQ (%)	TOTALI	FREQ (%)	TEMATICA "TEA"	FREQ (%)
Media								
- Generalisti	68	58,6	11	37,9	116.319	85,5	15	9,1
- Specializzati	35	30,2	13	44,8	16.960	12,5	107	65,2
Parti sociali	13	11,2	5	17,2	2.691	2,0	42	25,6
Totale	116	100,0	29	100,0	135.970	100,0	164	100,0

Utenti generici	8.523	-	260	-	17.508	-	486	-
-----------------	-------	---	-----	---	--------	---	-----	---

**- Tabella 1 -**

*Numero di account e tweet raccolti per tipologia di media e tematica*

**Fonte:** elaborazioni CREA-PB

In termini numerici, **la tematica relativa alle TEA risulta molto marginale su *Twitter* per tutti i profili analizzati.** Infatti, per media e parti sociali sono stati estrapolati solo 164 *tweet* tematici, mentre per gli utenti generici si sale a 486, per un totale complessivo di 650 *tweet*. Inoltre, solo il 25% degli *account* di media e parti sociali ha trattato l'argomento in almeno un *tweet* (29/116), mentre gli utenti generici il 3% (260/8.523). Anche in termini di numero di *tweet*, la percentuale risulta irrisoria, pari allo 0,1% (164/135.970) per media e parti sociali, e 2,7% per gli utenti generici (486/17.508).

Nello specifico degli *account*, **i media specializzati hanno trattato maggiormente il tema delle TEA (44,8% sul totale), seguiti dai profili dai media generalisti (37,9%) e dalle parti sociali (17,2%). Per quanto riguarda il numero di *tweet*, i media specializzati hanno anche postato maggiormente (65,2% sul totale), seguiti, però, dalle parti sociali (25,6%) e dai media generalisti (9,1%).**

Infine, in termini di *tweet* medi sul periodo di osservazione, si è rilevato che i profili media specializzati hanno postato in media 0,81 *tweet* al giorno, seguiti dalle parti sociali con 0,34 *tweet* al giorno e dai media generalisti con 0,12 *tweet* al giorno. Per gli utenti della rete, invece, si sono registrati circa 30,3 *tweet* postati al giorno.

## Risultati dell'analisi del sentimento (i.e., Sentiment Analysis).

Nelle tabelle 2a e 2b, e graficamente in figura 1, sono riportati i valori percentuali dei *tweet* classificati come positivi, negativi e neutri, ottenuti con la risorsa per l'analisi del sentimento per l'italiano chiamata *Weighted-Morphologically-inflected Affective Lexicon (WMAL)* (Risorsa sviluppata dal CREA-Politiche e Bioeconomia e dal Dipartimento di Informatica della Università di Torino nel 2020: Vassallo, M., Gabrieli, G., Basile, V., & Bosco, C. (2020). Polarity imbalance in lexicon-based sentiment analysis. In J. Monti, F. Dell'Orletta, & F. Tamburini (Eds.), CEUR workshop proceedings: vol. 2769, Proceedings of the seventh Italian conference on computational linguistics, CLiC-It 2020, Bologna, Italy, March 1-3, 2021. CEUR-WS.org, URL: [http://ceur-ws.org/Vol-2769/paper\\_36.pdf](http://ceur-ws.org/Vol-2769/paper_36.pdf)), che tiene maggiormente conto del peso delle parole utilizzate nel social media *Twitter*.

I risultati mostrano tendenzialmente **un sentimento positivo generalizzato nei confronti di questa nuova tecnologia applicata al settore agricolo, in particolar modo per quanto riguarda gli addetti del settore**. Infatti, sia **le parti sociali che i media specializzati** mostrano una **polarità positiva totale rispettivamente del 78,5% e del 76,6%** (tabella 2b). Anche i media generalisti confermano un atteggiamento positivo, seppur leggermente inferiore in termini percentuali, pari al 60% e quindi con un 40% di giudizi totali negativi. Gli utenti generici mostrano lo stesso sentimento dei media generalisti, con un 59,4% di giudizi positivi e un 40,3% di negativi. Inoltre, **per tutti i profili, risulta pressoché assente un atteggiamento neutrale alla tematica**, salvo per gli utenti generici della rete con uno 0,2%. Tale aspetto denota una forte presa di posizione alla tematica, sia positiva che negativa.

	Molto Negativo	Negativo	Neutrale	Positivo	Molto positivo	Totale
Media						
- Generalisti	20,0	20,0	0,0	46,7	13,3	100,0
- Specializzati	4,7	18,7	0,0	65,4	11,2	100,0
Parti sociali	0,0	21,4	0,0	45,2	33,3	100,0
Utenti generici	10,5	29,8	0,2	44,2	15,2	100,0

**Tabella 2a** – Sentiment analysis (%) a 5 categorie per tipologia di utente

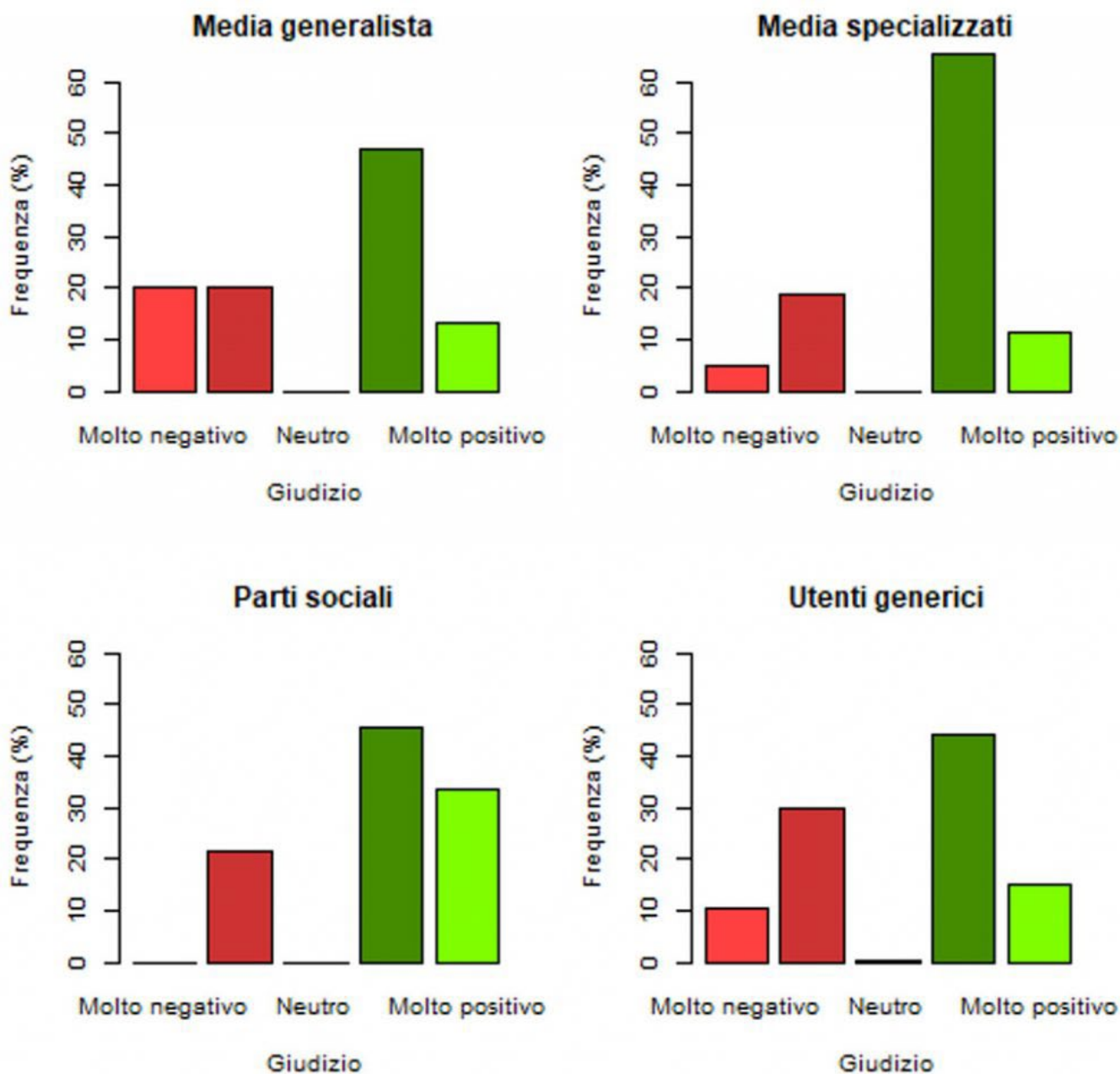
**Fonte:** elaborazioni CREA-PB

	Negativo	Neutrale	Positivo	Totale
Media				
- Generalisti	40,0	0,0	60,0	100,0
- Specializzati	23,4	0,0	76,6	100,0
Parti sociali	21,4	0,0	78,5	100,0
Utenti generici	40,3	0,2	59,4	100,0

**Tabella 2b** – Sentiment analysis (%) a 3 categorie (molto negativo e negativo; molto positivo e positivo) per tipologia di utente

**Fonte:** elaborazioni CREA-PB





**Figura 1** – Sentiment Analysis – valori percentuali a 3 categorie per tipologia di utente

Fonte: elaborazioni CREA-PB

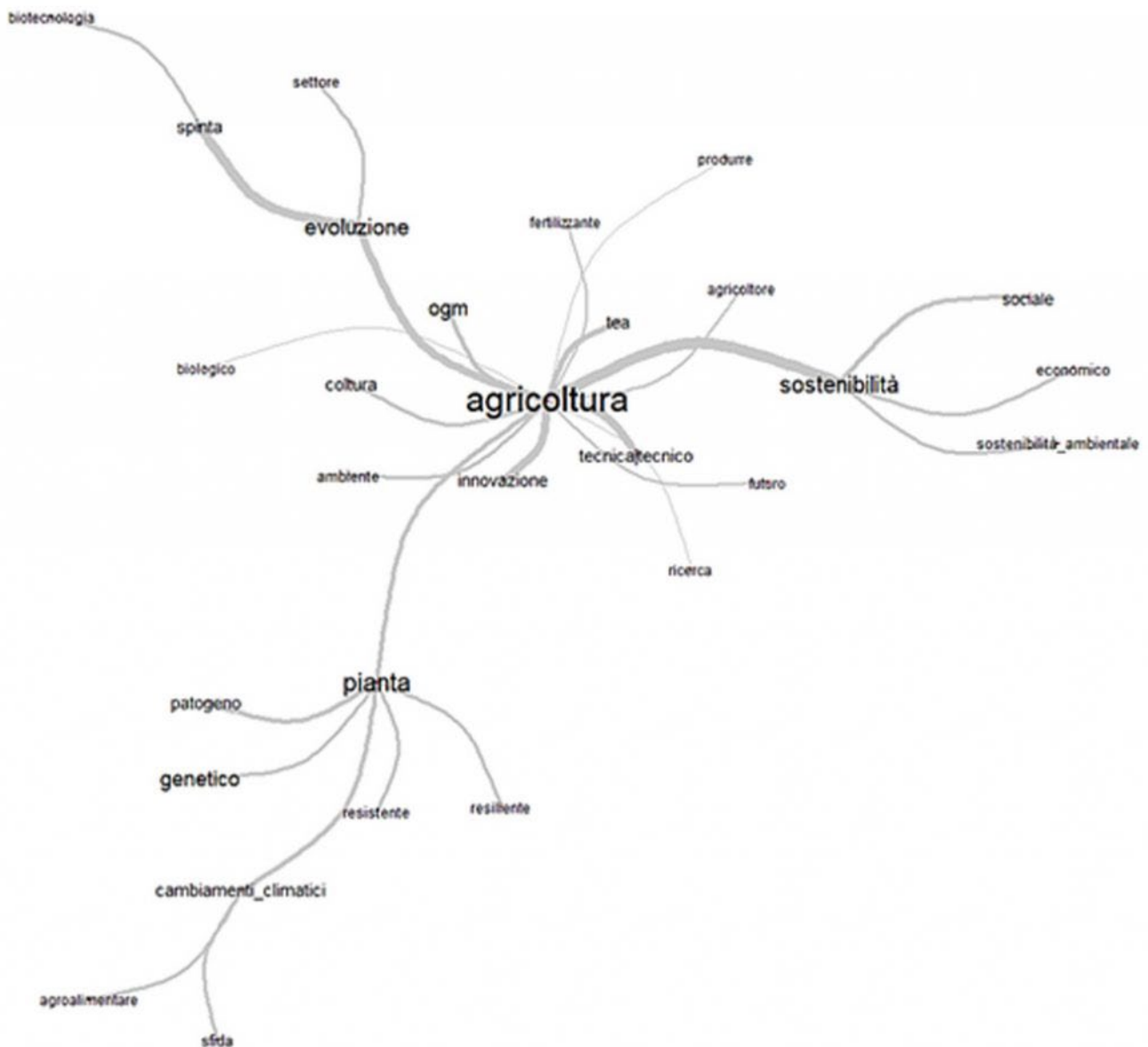
Nella successiva tabella 3 vengono riportati degli esempi di *tweet* ai quali sono associati i punteggi di *sentiment*, frequenza di *likes* (ossia quante volte è piaciuto quel *tweet* da altri utenti) e frequenza di *re-tweet* (ossia quante volte quel *tweet* è stato condiviso con altri utenti).

Testo del tweet	Punteggio Sentiment	Giudizio	frequenza di likes	frequenza di re-tweet
(Media_Generalista) La temperatura è stata più calda tanto da accelerare il ciclo vitale di una pianta di 10 giorni portare acqua alle piante nella stagione estiva è sempre più difficile. Abbiamo bisogno di piante che siano adatte al clima di domani	-1,92	Molto negativo	86	26
(Utente_Generico) Abbiamo bisogno di genetisti capaci di creare colture OGM con rese sempre maggiori per poter far fronte ad una popolazione mondiale sempre più ricca ed affamata. Abbiamo bisogno di coltivazioni estensive con l'uso di automazione. Della nonnina a caso ce ne facciamo un gran poco.	1,33	Positivo	41	6
(Parti_Sociali) #Ricerca: il presidente della #Copagri Tommaso #Battista intervieni a @Montecitorio alla conferenza stampa di @CiboPer_LaMente sulle Tecniche di Evoluzione Assistita-#TEA, con #Centinaio, #DeCarlo e #Nevi, firmatari delle 3 Pdl in merito sulla #sperimentazione in campo.	0,80	Positivo	13	6
(Utente_Generico) NUOVI OGM, DEREGULATION IN VISTA IN UNIONE EUROPEA? Friends of Earth Europe (FOEE), la più grande rete di organizzazioni ambientaliste europee, denuncia l'influenza delle lobby di Big Ag sulla Commissione europea e i pericoli in corso.	-0,26	Negativo	10	6
(Media_Specializzato) Ddl #Tea, rilanciare l'innovazione in agricoltura con le tre proposte di legge sulle tecniche di evoluzione assistita. VIDEOINTERVISTE a @raffaelenevi, @decarlosindaco, Fossato, @simovela e @TBattistat @CREARicerca @CiboPer_LaMente	1,38	Positivo	24	10

**Tabella 3** – Esempi di tweet con punteggio di Sentiment, frequenza di likes e re-tweet (nel testo capita di trovare dei simboli quali #, @, che, nel linguaggio di Twitter, fanno rispettivamente riferimento agli hashtags e agli account di utenti)

In questo numero, a supporto dell'analisi del sentimento, è stata proposta una analisi automatica chiamata delle similarità, o grafo delle co-occorrenze, che rappresenta sia quante volte una parola, pubblicata all'interno di uno o più *tweet*, viene menzionata (più è grande la parola nel grafo e maggiormente viene scritta) che quante volte si è collegata ad un'altra (più i rami all'interno del grafo sono spessi e più volte quella parola si è collegata con le altre). Nella successiva figura 2 viene riportato questo grafo delle co-occorrenze basato

sui testi raccolti nel complessivo campione dei 650 *tweet*, senza fare distinzione per tipologia di utente. Questo per fornire una immagine complessiva del fenomeno delle TEA applicate in agricoltura.



Il grafo evidenzia che il termine **agricoltura**, che risulta essere ovviamente il termine più centrale, collega tematiche quali:

- – **Evoluzione**, che a sua volta si collega alla spinta che si cerca tramite le biotecnologie applicate al settore agricolo;
- – **Sostenibilità**, che raggruppa i suoi principali aspetti quali sociale, ambiente ed economico;
- – **Pianta**, il cui collegamento con altri termini nel grafo sintetizza le difficoltà che le colture attuali hanno in termini di adattamento ai cambiamenti climatici e ai patogeni. Si richiedono, quindi, **innovazioni per rendere maggiormente resistenti e resilienti le piante a vincere tale sfida.**

Inoltre, per quanto riguarda sempre il **termine centrale, l'agricoltura, ad esso sono collegati termini relativi alla tematica oggetto d'analisi, ovvero le TEA insieme a molte delle questioni che le ruotano attorno, quali**



**gli OGM, la diminuzione dei fertilizzanti richiesta dal *Green Deal*, gli agricoltori, le coltivazioni biologiche maggiormente soggette ai cambiamenti climatici e, quindi, alla produzione.**

Questo a dimostrare l'importanza del ruolo delle TEA e suoi collegamenti in ambito agricolo e agroalimentare.

## **Considerazioni conclusive**

Le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) sono un argomento nuovo e di interesse per il settore agroalimentare e agricolo, rimane però molto specifico, tale che il numero di relativi tweet risulta molto esiguo sia nei media che nelle parti sociali in questi primi cinque mesi del 2023. **Gli utenti generici, ne parlano un po' di più, ma il loro sentimento è simile quello dei media generalisti ossia ottimistico ma non troppo, mentre i media specializzati sono quelli più positivisti, con le parti sociali anche loro tendenzialmente positive verso le TEA.** Questo risultato induce a pensare che sebbene la tematica sia ovviamente di interesse, toccando vari ambiti dell'agroalimentare e dell'agricoltura in genere, resta ancora un argomento per addetti ai lavori, guardata con un sentimento di prudenza da tutti gli altri.

**creafuturo**  
le sfide della ricerca agroalimentare



**MINISTERO DELL'AGRICOLTURA  
DELLA SOVRANITÀ ALIMENTARE  
E DELLE FORESTE**

