



PARTE SESTA

# TECNICHE COLTURALI

ONLINE – APPROFONDIMENTO 15.1

# MODERNE TECNICHE DI MIGLIORAMENTO GENETICO

Guido Baldoni

## 15.1.1 LE COLTURE IN VITRO NEL MIGLIORAMENTO GENETICO

Le colture in vitro consentono di ottenere nuove piante partendo da minuscoli pezzi vegetali, costituiti da poche cellule (micropropagazione), che sono allevati in condizioni ambientali e nutritive controllate e in assoluta asepsi.

La tecnica si svolge nelle seguenti fasi:

*a)* Prelievo e sterilizzazione del materiale vegetale (espianto), che viene fatto crescere su substrati nutritivi (sterili, contenenti fitormoni e nutrienti), generalmente posti in provette, tenute in camere di crescita.

*b)* Sviluppo dagli espianti di calli (insieme di cellule totipotenti) dai quali si formeranno tutti gli organi della pianta.

*c)* Crescita in serra delle nuove piante, che necessitano di una graduale acclimatazione prima di essere coltivate in campo.

La micropropagazione offre notevoli vantaggi applicativi, fra i quali si possono citare i seguenti:

1. Moltiplicazione in tempi brevi.

Partendo da pochi espianti è possibile ottenere un'elevata quantità di materiale. A titolo d'esempio,

a partire da un unico pezzo di foglia, nel giro di 6 mesi si possono creare alcune migliaia di nuove piante.

2. Sanità del materiale propagato.

Prelevando tessuti che risultano sani in appositi test, e lavorando in ambiente asettico, si ottengono piante esenti da patogeni. Per esempio, utilizzando espianti degli apici meristematici (quindi da tessuto appena formato, privo di virus) è possibile ottenere il risanamento dalle virosi di intere Cv di specie a propagazione agamica, come la patata, la canna da zucchero, ecc.

3. Possibilità di operare al di fuori delle condizioni climatiche naturali.

In ambiente controllato si possono eseguire più generazioni all'anno, velocizzando il miglioramento genetico

Le colture in vitro hanno permesso notevoli risultati in agricoltura. Ad esempio, hanno contribuito alle seguenti attività:

*a)* Conservazione del germoplasma.

La micropropagazione è la tecnica più adeguata a conservare una collezione di germoplasma in poco spazio. Il metodo della crioconservazione consente di mantenere embrioni e meristemi di qualsiasi specie in provette a bassissime temperature, ottenute utilizzando azoto liquido (temperature di circa -200°C). Tale tecnologia è adottata dalle banche del germoplasma, dislocate in varie parti del mondo. Una loro

lista può essere reperita in <https://www.ecpgr.cgiar.org/resources/germplasm-databases/list-of-germplasm-databases>

*b) Coltura di embrioni.*

La tecnica fornisce la possibilità di effettuare incroci interspecifici altrimenti non realizzabili con tradizionali metodologie per incompatibilità nella fecondazione o per degenerazione degli embrioni. In vitro, il processo di formazione degli zigoti e lo sviluppo degli embrioni può essere portato a termine in condizioni controllate e asettiche, con la creazione di nuove specie. È un metodo che ha dato buoni risultati con alcune Cucurbitaceae e Solanaceae.

*c) Ottenimento di individui omozigoti.*

Le cellule riproduttive presenti nelle antere di alcune specie sono in grado, in particolari condizioni, di moltiplicarsi agamicamente e dare origine a plantule aploidi. Questa proprietà è importante in quanto raddoppiando con la colchicina il corredo cromosomico dell'individuo originatosi si ottiene un organismo omozigote per tutti i caratteri. La tecnica è stata applicata su molte colture, come, ad esempio, frumento, orzo, riso e girasole.

*d) Fusione di protoplasti.*

Operando in vitro si possono ottenere nuove piante per fusione del materiale cellulare (protoplasti). Le fasi operative di questa tecnica sono, schematicamente:

1. Eliminazione enzimatica della parete cellulare (costituita da cellulosa e pectine);
2. Fusione dei protoplasti, per azione del polietilenglicol (PEG) o di stimoli elettrici;
3. Rigenerazione dell'ibrido somatico ottenuto.

Il metodo viene adottato per ottenere un ibrido fra specie geneticamente distanti o per superare barriere di autoincompatibilità nella fecondazione, presenti in alcune specie (es. Brassicaceae).

## 15.1.2 ALTRI METODI DI MIGLIORAMENTO GENETICO

### Mutagenesi (induzione alla mutazione)

Le mutazioni spontanee, che hanno una frequenza molto bassa, sono alla base della variabilità biologica esistente in natura, originatasi in seguito alla continua selezione da parte dell'ambiente. Le mutazioni

possono interessare il materiale ereditario a diversi livelli: genico, genomico e cromosomico. Possono essere utili o meno; nella maggior parte dei casi provocano una perdita di funzioni che porta alla morte dell'organismo; a volte, però, possono essere favorevoli. La tecnica della mutagenesi è basata sull'aumento della frequenza delle mutazioni in una specie coltivata, in modo da aumentarne la variabilità genotipica, su cui innestare una selezione in modo da mantenere nelle generazioni i genotipi più interessanti. Con tale tecnica negli anni '70 in Italia sono state costituite diverse varietà di frumento duro, fra le quali il 'Creso', la cui resistenza al freddo ne ha permesso la coltivazione anche alle regioni italiane più settentrionali.

La mutazione può essere indotta su vari organi (semi, antere, organi di propagazione vegetativa, ecc.) e gli agenti mutageni possono essere di natura chimica (es. iprite azotata, solfato dietilico) o fisica (raggi X, radiazioni UV-A,  $\beta$  e  $\gamma$ ). Tra essi va inclusa anche la colchicina, prodotta da piante del genere *Colchicum*, che è in grado di raddoppiare il genoma di un organismo, interrompendo la formazione del fuso mitotico durante la meiosi. Con la colchicina si possono creare piante poliploidi con caratteristiche interessanti. Ad esempio, le varietà triploidi del banana e del cocomero producono frutti senza semi (partenocarpia) e quelle di barbabietola hanno un maggiore contenuto zuccherino. Inoltre, il raddoppio di un corredo cromosomico rende fertile l'incrocio fra due specie distanti fra loro, consentendo l'appaiamento dei cromosomi omologhi durante la meiosi. Per esempio, così è stato creato, negli anni '60, il triticale, incrocio interspecifico fra grano e segale.

### Marcatori molecolari e MAS (selezione assistita)

Il rapido sviluppo della genetica molecolare registrato nell'ultimo ventennio ha reso la costituzione di nuove varietà più veloce ed efficace. Un marcatore molecolare («marker») è un frammento di DNA, la cui presenza contraddistingue un individuo in modo inequivocabile.

Caratteristica dei marcatori molecolari è quella di non essere riferibili all'attività di specifici geni, ma di rilevare direttamente le differenze (polimorfismi) nella sequenza nucleotidica del DNA. Questi polimorfismi possono essere dovuti a inserzioni, delezioni, traslocazioni, mutazioni puntiformi, ecc.

I marcatori RFLP («Restriction Fragment Length Polymorphism») permettono di evidenziare polimor-

fismi basandosi sulle differenze del peso molecolare di frammenti di DNA ottenuti dalla digestione con enzimi di restrizione («primer»). I marcatori RAPD («Random Amplified Polymorphic DNA») prevedono, invece, l'impiego congiunto di più primer per rilevare eventuali differenze nella sequenza nucleotidica, sulla base di dati qualitativi (presenza/assenza delle bande). I marcatori AFLP («Amplified Fragment Length Polymorphism») consentono di rilevare polimorfismi per la lunghezza di frammenti amplificati, cioè basandosi sull'amplificazione selettiva di determinati frammenti di DNA ottenuti con particolari enzimi di restrizione. I marcatori SNP («Single Nucleotide Polymorphism»), cioè polimorfismo di singoli nucleotidi) consentono di accertare polimorfismi riconducibili a differenze tra singoli nucleotidi. Per la rilevazione dei marcatori SNP sono disponibili diverse tecniche. Una delle più comuni consiste nell'amplificare, con primer idonei, specifiche regioni dei geni di interesse in diverse Cv e nel sequenziare i prodotti dell'amplificazione, in modo da evidenziare eventuali mutazioni puntiformi (inserzioni, delezioni, sostituzioni di geni). Con questo metodo si può anche eseguire una ricerca di SNP in silicio, basata sul confronto dei nucleotidi con una serie di sequenze EST («Expressed Sequence Tag») e/o cloni genomici, ottenute da Cv conservate in banche dati. I marcatori su sequenze EST forniscono informazioni su precise regioni del genoma e offrono, quindi, la possibilità di mappare i singoli geni di interesse. Data l'elevata frequenza con cui avvengono le mutazioni puntiformi, gli SNP sono considerati i marcatori con il più alto potenziale di rilievo del polimorfismo genomico e, grazie ad altri vantaggi, quali la codominanza e l'elevata ripetibilità, rappresentano la classe di marcatori del futuro, con innumerevoli applicazioni nel miglioramento genetico delle colture. I marcatori SSR («Simple Sequence Repeat») sono sequenze di DNA che consistono in corte unità da 1 a 6 bp (1 base pair = 600 Daltons), ripetute in tandem. L'importanza e il valore di questi marcatori derivano dal fatto che sono di natura multiallelica e si trasmettono in modo codominante. Sono di norma abbondanti, ben distribuiti nei genomi e facili da evidenziare. A tal scopo si utilizza una PCR (reazione a catena della polimerasi) per amplificare i frammenti ottenuti sulla base di coppie di primer specifici di 16-18 bp che fiancheggiano il microsatellite, definendo il locus. I marcatori SSR presentano notevoli vantaggi, quali la possibilità di analizzare piccole quantità di DNA (0,05 µg), semplicità e rapidità di utilizzo, bassi costi, alta affidabilità e riproducibilità del risultato.

Tutte queste caratteristiche rendono i marcatori SSR particolarmente adatti all'identificazione varietale e alla selezione assistita. L'utilità dei marcatori molecolari per quest'ultimo scopo è basata sull'esistenza di un'associazione fra il marcatore e i geni di interesse, che permette di seguire la segregazione del gene, saggiando la presenza del marcatore. In tal modo la selezione per i caratteri desiderati viene svolta su base genotipica e non fenotipica. Ciò aumenta significativamente l'efficienza dell'analisi dell'espressione dei geni che codificano per caratteri quantitativi (QTL = «quantitative traits loci») e il recupero del genotipo del parentale ricorrente nei programmi di reincrocio.

Avendo un potere di risoluzione superiore rispetto sia ai marcatori morfologici sia a quelli isoenzimatici, i marcatori molecolari, in particolare quelli basati sulla PCR, sono i più interessanti nei programmi avanzati di costituzione varietale.

## Transgenesi e genomica

Una pianta transgenica è un organismo nel cui DNA sono state introdotti una o è più sequenze nucleotidiche provenienti da altri organismi, appartenenti o meno alla stessa specie, dopo opportune modifiche. L'ottenimento di una pianta transgenica richiede le seguenti azioni:

1. Individuazione, nell'organismo donatore, di una sequenza genica favorevole, interessante;
2. Moltiplicazione della sequenza in plasmidi batterici (es. in *Escherichia coli*, Migula, Castellani & Chalmers);
3. Trasferimento dei plasmidi in un batterio vettore (es. *Agrobacterium* spp. ingegnerizzate);
4. Trasferimento del vettore nella pianta ricevente;
5. Rigenerazione in vitro della pianta ricombinata;
6. Accertamento, con prove molecolari in laboratorio, dell'avvenuto trasferimento della sequenza genica e, con prove di campo, della fissazione del carattere nella Cv transgenica.

Per il trasferimento dei frammenti di DNA nella cellula ospite si è fatto ricorso a plasmidi ingegnerizzati del batterio *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, ma il metodo è stato criticato, essendo un batterio patogeno per l'uomo. Più recentemente si sono quindi adottate tecniche di trasferimento chimico-fisiche, come l'assunzione diretta del DNA per microiniezione, uso di microproiettili, elettro-incorporamento).

Le prime realizzazioni pratiche di organismi transgeni di piante coltivate sono state ottenute in mais, soia, cotone, colza e tabacco.

Significativi successi si sono conseguiti nell'ambito della resistenza agli erbicidi (particolarmente al glyphosate) e della tolleranza a numerosi, specifici, parassiti (insetti, come la piralide del mais, virus, batteri e funghi). Oggi il metodo viene applicato per accrescere la tolleranza delle piante alla siccità e alla salinità. Interessati sono anche il metabolismo dell'accumulo di sostanze di riserva, la fotosintesi clorofilliana, la fissazione e l'assimilazione dell'azoto.

La transgenesi ha consentito l'ottenimento di nuove Cv in modo più mirato e molto più rapido rispetto al miglioramento genetico tradizionale, e permette di approfondire le conoscenze sulla biologia vegetale. Le piante transgenetiche vengono definite OGM (Organismi Geneticamente Modificati) e, per alcune colture, hanno ormai preso il sopravvento. Per esempio, l'80% delle coltivazioni mondiali di mais e soia è attualmente OGM. La loro coltivazione è però oggi vietata in molti stati Europei (Italia inclusa).

L'insieme delle nuove tecnologie che permettono di «marcare» («*taggare*») e seguire la trasmissione ereditaria di un complesso di geni contemporaneamente viene definito genomica. Essa ha un enorme potenziale nel settore del miglioramento delle piante di interesse agrario poiché permette il miglioramento di caratteri poligenici complessi. Le recenti acquisizioni della genomica sono alla base di una terza rivoluzione agricola («*gene revolution*») che si annuncia ancora più innovativa della rivoluzione verde («*green revolution*») del secolo scorso e della prima rivoluzione del Neolitico.

## Tecnologie di evoluzione assistita (TEA)

Le New Breeding Techniques, in Italia note come Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) rappresentano l'ultima frontiera del miglioramento genetico delle colture e per la loro messa a punto Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier sono state insigne del premio Nobel per la chimica nel 2020.

Le metodiche utilizzano «forbici molecolari» (enzimi di restrizione) per individuare e modificare frammenti di DNA di una pianta che codificano una data funzione fisiologica. Ciò avviene senza introdurre nel genoma alcun frammento estraneo, quindi non dando origine a organismi geneticamente modificati (OGM), che sono ancora proibiti in molti paesi.

Con le TEA, ad esempio, è stato ottenuto il nuovo pomodoro 'Sicilian Rouge High GABA', con elevata capacità di produrre acido  $\gamma$ -aminobutirrico (GABA), un nutriente utile ad abbassare la pres-

sione sanguigna. Oppure si possono «silenziare» alcuni geni che rendono la pianta suscettibile a una determinata malattia o, ancora, attivare geni per la resistenza a sostanze attive erbicide, come il riso reso resistente al diserbante imazamox, nell'ambito del programma clearfield® della Basf che permette di liberare la coltura dalla presenza di riso crodo.

## Nanotecnologie

Anche le nanotecnologie avranno probabilmente un ruolo importante nel miglioramento genetico dei prossimi anni. Si tratta di tecniche estremamente sofisticate per la creazione di sensori, accumulatori di energia solare, motori e strumenti vari di dimensioni molecolari che potranno essere utilizzati, per esempio, nel rilevamento istantaneo di patogeni, tossine o metalli pesanti nelle piante e negli alimenti, nella diagnosi dello stress a livello cellulare, nella somministrazione di fitofarmaci a specifici bersagli all'interno della pianta, nella modulazione della fotosintesi ecc.

## Base genetica delle Cv commercializzate

Il termine Cv (cultivar), a volte usato come sinonimo di varietà, viene applicato a popolazioni con una base genetica variabile in funzione del tipo di riproduzione caratteristico della specie.

a) La Cv di una specie che si riproduce per seme con impollinazione autogama viene definita «varietà a libera fecondazione» e si identifica con una linea pura omozigote. La Cv è costituita, cioè, da piante con un solo corredo cromosomico, originate da un unico capostipite, che si riproducono per autofecondazione. Il loro genotipo non si modifica passando da una generazione all'altra, ad eccezione di eventuali, rari, eventi di crossing over e mutazioni. L'agricoltore può riservare un po' del seme raccolto in un anno per riseminarlo nell'annata successiva, senza perdita dell'identità varietale e senza significativi cali produttivi.

b) Una Cv a libera fecondazione può essere costituita anche da varietà sintetiche, diffuse specialmente tra le piante foraggere (es. erba medica, trifogli, Dactylis, Lolium e altre Poaceae da foraggio). Le varietà sintetiche sono ottenute dal libero incrocio tra piante più o meno eterozigoti, selezionate e moltiplicate per 3 – 4 generazioni a cura della ditta sementiera, che deve prendersi in carico gli oneri della

conservazione nel tempo del nucleo originario della popolazione che, durante gli anni, potrebbe aver perso le caratteristiche iniziali per drift genetico o selezione naturale. Le Cv sintetiche possono essere lasciate a libera fecondazione per un po' di anni, senza perdere le caratteristiche favorevoli.

c) Una Cv di specie allogama è invece spesso costituita tutta da individui eterozigoti di prima generazione (ibridi  $F_1$ ), derivati dall'incrocio tra piante di linee pure omozigoti, attuato, ogni anno, a cura della ditta sementiera. In questo caso si sfrutta il fenomeno dell'eterosi (o lussureggiamento dell'ibrido) consistente nelle migliori performance produttive dell'ibrido rispetto alle due linee pure parentali. L'agricoltore non può usare il seme raccolto per seminarlo l'anno successivo. Ciò comporterebbe la coltivazione della popolazione  $F_2$ , con la segregazione dei caratteri, che ridurrebbe la resa per la comparsa di individui omozigoti, delle linee pure parentali.

d) Le Cv di specie a propagazione vegetativa, infine, si identificano con i cloni. Gli individui che li costituiscono hanno tutti il medesimo genotipo e non si possono riprodurre per seme perché manifesterebbero un'ampia variabilità, con la comparsa di individui non sempre favorevoli. Cv di questo tipo sono presenti nella maggior parte delle arboree (che si moltiplicano per talea, margotta o innesto) e in alcune specie erbacee, quali patata, fragola, aglio, ecc.

### 15.1.3 LA CONSERVAZIONE DELLE CV

Una delle caratteristiche fondamentali delle moderne Cv è l'uniformità delle caratteristiche fenotipiche. Solo le Cv uniformi sono in grado di soddisfare le esigenze della moderna produzione agricola, di reagire allo stesso modo alle pratiche agricole e di essere raccolte tutte in un unico momento. Le loro caratteristiche devono rimanere costanti negli anni, di generazione in generazione. Il mantenimento della base genetica di una CV è demandato al costituente, che deve assicurare l'assenza, in essa, di individui fuori-tipo (off-type) sia tra le specie a fecondazione autogama (variabilità causata da ibridazioni casuali, da mutazioni, da drift genetico, ecc.) sia tra quelle allogame, ove può essere causata da mutazioni, crossing over e fecondazione da pollini estranei. La ditta deve dunque conservare il seme del nucleo originario, moltiplicandolo, ciascun anno in parcelle dove si applica una continua selezione di mantenimento. Essa è condotta sulla stessa varietà commercializzata nelle specie autogame, mentre nelle allogame la conservazione viene svolta nei riguardi delle linee pure parentali dell'ibrido.

La conservazione del materiale propagativo delle specie a riproduzione agamica non pone grossi problemi dal punto di vista genetico. La ditta sementiera deve solo mantenere il genotipo iniziale, che deve essere uguale per tutti i propaguli commercializzati.