

## Genetica molecolare nel futuro delle innovazioni per l'agricoltura

*F. Salamini, D. Ederle, PTP, Lodi e Fondazione Mach, S. Michele, Trento*

### Sintesi

Viene presentato il ruolo dell'innovazione scientifica, specificamente della genetica molecolare, in termini di sostenibilità dei sistemi colturali vegetali. Si introducono prima le modifiche in atto nelle diete delle popolazioni mondiali, le previsioni di sviluppo delle popolazioni e la necessità di aumentare le produzioni di cereali e l'intensificazione agricola associata ad un uso di 2,5x di azoto e di 1,7x di suoli agrari irrigati. I dati disponibili introducono il problema della sostenibilità dei sistemi agricoli, specialmente considerando l'impatto ecologico dell'agricoltura intensiva.

Il corpo centrale della relazione viene sviluppato in due sezioni che definiscono prima un possibile scenario delle agricolture del futuro, e poi le azioni necessarie per raggiungere la sostenibilità delle pratiche agricole, come emerge dalla considerazione degli sviluppi delle scienze biologiche e molecolari. Il punto di partenza si rifà alla constatazione che qualunque possa essere la scelta futura relativa ai nuovi sistemi agricoli, questi oltre che sostenibili dovranno essere intensivi. Il concetto emergente utile a mettere in pratica una simile strategia è di adattare la pianta all'ambiente e non di continuare a sviluppare azioni di protezione intervenendo con metodi agrotecnici. Da qui discende un primo gruppo di riflessioni che riguardano gli attributi funzionali delle piante che i nuovi sistemi agricoli dovrebbero interpretare. Lungo questa linea vengono prodotte osservazioni che riguardano: la possibilità di aumentare la produzione di biomassa, da utilizzare eventualmente anche a fini energetici, con un accenno alla massimizzazione delle rese fotosintetiche; la convenienza a trasformare le specie agrarie annuali in perenni, o comunque poliennali e tali da occupare il terreno agrario per periodi temporali molto lunghi; la necessità che le nuove varietà o le nuove specie resistano agli stress biotici e abiotici che prevalgono nei biotopi agricoli; la considerazione di modelli vegetali immuni da malattie microbiche; la necessità di sfruttare l'eterosi anche per piante erbacee, attraverso meccanismi molecolari in grado di sostenere lo sviluppo di semi-apomittici. Segue una presentazione dell'arsenale metodologico disponibile oggi agli operatori interessati al miglioramento genetico molecolare delle piante agrarie. Emergono scoperte di biologia molecolare dalle quali si sono sviluppate applicazioni agricole. Un esempio discusso riguarda il meccanismo molecolare alla base della resistenza genetica della pianta ai potivirus. Viene poi approfondito il ruolo dei piccoli RNA (miRNAs; siRNAs; ta-siRNAs) nel controllo di importanti caratteri, come epoca di fioritura, resistenza al secco, sviluppo della pianta. Le possibilità di movimento sistemico di queste molecole nella pianta apre importanti applicazioni, anche in termini, per esempio, di rapporti tra un portainnesto e la parte aerea produttiva della pianta. Sono anche menzionate tecnologie che permettono o di isolare mutazioni, o di indurre le stesse, in specifici geni target che hanno un elevato interesse genetico e agronomico. Il trattamento dell'arsenale tecnologico oggi disponibile al miglioramento genetico ha come fuoco centrale la considerazione dei marcatori molecolari e dei piani di selezione assistita (MAS) che gli stessi permettono. E' discusso il loro ruolo nella comprensione della variabilità genetica quantitativa e nel definire quali effetti genici (QTL) la influenzano. Anche il ruolo che in questi processi giocano la genomica e la selezione genomica viene esemplificato. Si accenna anche alla possibilità che per migliorare alcuni caratteri possa essere utilizzata la trasformazione genetica (incluse le tecnologie di cisgenesi).

La parte conclusiva è dedicata alle interazioni tra innovazione, pratica agricola e ambiente, accennando anche alla transizione verso la sostenibilità. Il risparmio di suoli agrari evitando la messa in coltura di nuove terre e, quindi, privilegiando l'intensificazione colturale, dipende da un corpo consistente di acquisizioni sperimentali che suggeriscono nuove tematiche di ricerca genetica ed agronomica.

**Nota.** Le parti introduttive e conclusive di questa relazione risentono di una precedente lezione tenuta nel 2005 da F.S. presso la Fondazione Rossi-Doria.

**Parole chiave:** sostenibilità dell'agricoltura, cibo e popolazioni, transizione alla sostenibilità, innovazione, biotecnologia, genomica, miglioramento genetico molecolare, OGM.

## **1. Diete e cambiamenti dei sistemi agricoli**

Una serie di indicatori socio-biologici mette in evidenza che i sistemi utilizzati per produrre cibo e alimenti animali sono cambiati a confronto con l'ultimo decennio del secolo scorso. Le tendenze più evidenti (von Braun 2007; Evans 2009; Clarke e King, 2004; UNPFA, 2007; Naylor et al, 2005) riguardano la dieta umana che si modifica con l'arricchimento in carne e di prodotti ortofrutticoli che da un lato richiedono un aumento della produzione cerealicola, mentre dall'altro riducono le superfici ad essi dedicabili; la progressiva riduzione della disponibilità di acqua, incluso il suo uso inappropriato; l'accelerazione dell'inurbamento nei paesi in via di sviluppo; le oscillazioni e la progressiva erosione delle riserve mondiali di cereali e delle maggiori *commodities* agro-alimentari; la mancata produzione di cibo imputabile a guerre o ad altre decisioni politiche. Ad aggravare le negative condizioni messe in evidenza dagli indicatori citati, si aggiungono le stime delle produzioni di cereali dell'Asia che hanno raggiunto livelli difficilmente migliorabili (Salamini, 2005).

## **2. Sostenibilità dell'agricoltura**

Nel 2030 la popolazione mondiale raggiungerà gli 8,2 miliardi (5 dei quali concentrati in aree urbane). Nel 2008 le persone residenti in città (3,3 miliardi) hanno superato per la prima volta quelle rurali e questa tendenza è più accentuata nei paesi in via di sviluppo dove le previsioni indicano che, per il 2030, l'80% della popolazione sarà urbana. Nel 2050 è previsto il superamento della soglia di 9 miliardi. Questa popolazione di esseri umani può essere nutrita se aumenterà la produzione di cereali, di carne e di tuberi. Saranno i paesi in via di sviluppo (PVS) a guidare principalmente questa domanda di maggiori risorse alimentari, sia perché sono le loro popolazioni che si presentano ancora in attiva crescita, sia perché anche in molti di essi sta emergendo l'esigenza di diete più ricche e bilanciate (FAO, 2002; UNPFA, 2007). La produzione mondiale di mais, grano e riso dovrà di conseguenza aumentare di circa l'1,2-1,4% annuo. La domanda proveniente dai paesi PVS non potrà essere soddisfatta solo con le importazioni. È perciò inevitabile che nei prossimi 20 anni vengano arate nuove terre vergini per una estensione di circa 120 milioni di ha per i soli PVS (+8% dell'attuale), considerando che la superficie ancora disponibile a fini agricoli è stimata estendibile del 12% rispetto all'attuale. Nello stesso periodo la produzione di cereali dovrà raggiungere, nel mondo, livelli di 4 t per ettaro all'anno (Cassmann, 1999; Dyson, 1999; Tilman, 1999; Brown, 2005). Questo scenario suggerisce di sviluppare programmi per raddoppiare ancora la produzione dei campi, quasi a ripetere la rivoluzione verde. L'attesa è che l'incremento delle rese ottenuto grazie alla ricerca possa contribuire al 70% del previsto aumento delle produzioni (Evans, 2009; OECD, 2007; FAO, 2010). Anche così sarà comunque difficile, specialmente nei paesi PVS, soddisfare la domanda di cibo, particolarmente di cereali. Ne deriva che la sostenibilità della produzione di cibo riguarda quasi esclusivamente le colture continuate dei cereali, visto il ruolo che queste piante hanno nei sistemi agricoli. L'intensificazione delle produzioni di frumento, riso e mais è stata il fattore che più ha contribuito al raddoppio delle produzioni di derrate agricole negli ultimi 50 anni. L'aumento si è ottenuto con un incremento di 6 volte nell'uso di azoto, 3,5 volte di fosforo, 1,7 volte delle aree sotto irrigazione e con l'aumento del 10% delle terre arate. Un ulteriore raddoppio delle produzioni richiederà da 2 a 3 volte più azoto e il raddoppio delle terre irrigate. L'intensificazione agricola ha però avuto ed avrà impatti negativi sugli ecosistemi naturali non agricoli, sia terrestri che acquatici. Per questo si sottolinea l'urgente bisogno di sviluppare pratiche agricole più efficienti e sostenibili. Infatti, I quattro più importanti sistemi agricoli basati sui cereali, benché siano altamente produttivi, non danno certezze di sostenibilità nel lungo periodo (Cassmann, 1999).

## **3. Impatto dell'agricoltura intensiva**

La produzione di cibo già da ora domina l'alterazione antropogenica del ciclo dell'azoto. L'attuale fissazione è doppia di quella delle epoche pre-industriali (150 milioni di t per anno da sintesi e da fissazione biologica; 40 milioni da combustioni). L'azoto fissato ha innalzato la concentrazione di ossido di azoto nell'atmosfera e crea problemi perchè: contribuisce all'aumento dei gas serra; riduce la fascia di ozono; nelle acque potabili ha effetti negativi sulla salute; contribuisce alla formazione di piogge acide; provoca l'eutrofizzazione degli ecosistemi acquatici. A questo va aggiunto che gli accumuli naturali di azoto sono in grado di assorbirne non più di 124 milioni di t per anno, sollevando la necessità di una ottimizzazione/riduzione nell'utilizzo di concimazioni azotate, anche attraverso azioni mirate di miglioramento genetico delle specie agrarie (Schlesinger, 2009; Subbarao, 2009).

L'erosione del suolo causata dall'agricoltura ha effetti sulla produttività delle piante: è, ad esempio, responsabile del dilavamento dei fosfati e quindi dell'eutrofizzazione dei sistemi acquatici, inducendo un uso ancora maggiore di fosfati. A fronte di questa crescente domanda, la disponibilità di giacimenti fosfatici è in contrazione e, per il 2035, è previsto il superamento della domanda sull'offerta (Hobbs, 2008; Goulding, 2008; Cordell, 2009).

La degradazione del suolo è causata da attività umane come deforestazione, eccesso di pascolamento e pratiche agricole inappropriate; è particolarmente grave in zone a clima arido, quelle meno adatte all'agricoltura (FRA, 2010). La diminuzione della produzione nei sistemi agricoli basati su doppi e tripli raccolti di riso irriguo potrebbe riflettere una tendenza progressiva alla degradazione dei suoli interessati.

L'agricoltura consuma circa l'80 - 90% dell'acqua dolce utilizzata dall'uomo. Le aree irrigue sono in aumento, sebbene a ritmi inferiori che nel passato. A fronte di questo incremento nell'uso delle risorse idriche, 34 paesi (che ospitano circa 500 milioni di persone) hanno problemi di aridità: tutti sono importatori di cereali. Nel 2025 i paesi con gli stessi problemi saranno 50. Nel 2050, da 3,5 a 7,7 miliardi di esseri umani vivranno in aree geografiche con scarsa disponibilità di acqua. La competizione tra usi agricoli e civili dell'acqua è inoltre già in atto nelle aree più densamente popolate del pianeta (FAO, 2002; Morison, 2008).

Sebbene si sia recentemente riaperto il dibattito su quanto del riscaldamento globale che stiamo sperimentando sia di origine antropica, è tuttavia indiscutibile che esso sia in atto. Di certo, nel processo ha un ruolo l'agricoltura che provoca emissioni nell'atmosfera di gas serra, in particolare ossido di azoto e metano. Sarebbe però necessario disporre di dati più precisi relativamente all'effetto dell'aumento di temperatura sugli ecosistemi agricoli (Watson et al, 1998). Ad esempio, se si dovesse verificare un significativo aumento del livello dei mari, questo influenzerà non poco le agricolture delle zone costiere dell'Asia.

Sarà difficile raddoppiare la produzione di cibo, per unità di terra coltivata, senza interferire con la biodiversità degli ecosistemi naturali. Inoltre, la necessità di espandere l'irrigazione ridurrà ulteriormente l'acqua concessa agli ecosistemi acquatici. L'azoto e il fosforo dilavati dalle nuove terre messe in coltura accentueranno l'eutrofizzazione delle acque, contribuendo alla scomparsa di specie e popolazioni selvatiche. La necessità di incrementare la produzione agricola, se trovasse risposta nella messa a coltura di nuove terre, andrebbe ad intaccare gli ecosistemi naturali anche e soprattutto in aree fragili e ad alta biodiversità (Tilman, 1999; Ewers, 2009).

Nei distretti agricoli più sfavoriti, la povertà si origina da una molteplicità di cause: densità della popolazione, deficit produttivo, clima, catastrofi, redditi bassi e suoli agricoli prone alla degradazione. L'effetto negativo della povertà sugli ecosistemi agricoli è in parte dovuto alla distruzione della foresta per iniziare forme agricole intensive, così come all'eccessivo pascolamento

o al ricorso scorretto all'irrigazione. Non è, con questo, che l'alleviamento della povertà non possa essere praticato con l'intensificazione dell'agricoltura: serve tuttavia comprendere che quanto è stato fatto di negativo in altri contesti non deve essere ripetuto, e che sono invece necessari nuovi approcci agronomici e nuove politiche (Tilman, 1999; OECD, 2007).

#### 4. Verso la sostenibilità

**Decidere.** Le politiche dei governi hanno la capacità di modificare le tendenze in atto nei sistemi agricoli. Le azioni auspicabili riguardano il management delle risorse idriche; i diritti di proprietà della terra coltivata e delle risorse naturali; l'opportunità di ritorno economico e assistenza sociale agli agricoltori più poveri; l'approvvigionamento energetico per l'agricoltura; lo sviluppo di infrastrutture rurali. A livello internazionale è necessario mantenere costanti le scorte di cereali; accordarsi sulle quote di elementi fertilizzanti da riservare a specifiche regioni o a specifiche colture; l'intensificazione del trasferimento tecnologico tra pubblico e privato; gli aiuti in natura a regioni che hanno sofferto carestie; gli accessi facilitati all'economia di mercato; la definizione di capitali di investimento da assegnare ai paesi in via di sviluppo. In particolare, i bilanci delle agenzie pubbliche che sostengono lo sviluppo indicano un decremento delle risorse allocate. Inoltre le regioni più povere del mondo, come l'Africa sub-sahariana e l'Asia del sud, attraggono solo il 10% del flusso del capitale privato investito in ricerca per lo sviluppo.

Una analisi della produttività della ricerca agricola indica che per ottenere gli stessi effetti oggi sono richiesti più tempo e più investimenti. La speranza è che la ricerca di tipo biotecnologico possa rovesciare questa tendenza. Il flusso di tecnologia dalla ricerca ai campi dovrebbe riguardare, oltre alle agrotecniche e alla gestione dei raccolti, anche il miglioramento delle risorse umane locali. La partecipazione dei consumatori e dei cittadini al dibattito agricoltura-ambiente dovrebbe, inoltre, contribuire a migliorare l'accettabilità dei risultati della ricerca agronomica avanzata (OECD, 2007; FAO, 2010).

**Sapere.** La prima necessità riguarda una precisa e profonda informazione agronomica sui sistemi di coltivazione, particolarmente dei cereali. Anche il management della qualità dell'acqua d'irrigazione, così come i principi della protezione dei raccolti, sono un bisogno percepito, ma non sviluppato. La rivoluzione verde introdusse un aumento nell'uso di composti agrochimici associato anche al concetto di lotta integrata. Malgrado nel tempo siano stati sviluppati diversi sistemi di lotta integrata (Bale, 2008), si deve sottolineare che essi non hanno avuto il successo sperato. Questo genera preoccupazione: è perciò urgente approfondire meglio la pratica della lotta integrata e le ragioni del suo parziale fallimento. Molto di più dovrebbe essere fatto per scoprire e precisare principi e regole che permettono l'intensificazione ecologica dell'agricoltura. Il concetto è vago e aperto a più precise quantificazioni scientifiche. La velocità di sviluppo delle malattie dipende dalla densità con cui si coltivano le piante (Plantegenest, 2007), un dato necessario per definire sia la diversità ottimale delle specie agrarie da coltivare, sia le specie in grado di sostituire quelle in coltura e il tipo di resistenza che è possibile accumulare nel genoma delle varietà coltivate. Anche l'idea che la stabilità della produzione primaria dei campi sia più elevata negli ecosistemi che contengono una diversità di specie necessita di approfondimento prima di poterla tradurre in principi di rilevanza pratica. Sarebbe anche importante comprendere come, in termini ecologici, il contributo delle diverse componenti degli ecosistemi può essere aumentato quando si procede con l'intensificazione dell'uso della terra. Il problema di questo approccio è che non abbiamo tempo sufficiente per mettere in pratica le strategie derivabili dagli studi ai quali si è accennato. La ricerca sulla diversità genetica tra ed entro comunità vegetali dovrebbe considerare: gli effetti negativi e positivi delle monocolture; le perdite di elementi nutritivi o la loro accumulazione nei biotopi agricoli; il declino produttivo delle coltivazioni di cereali intensive; la complessità delle

relazioni tra qualità del suolo e produttività dei sistemi agrari; le soglie critiche dei parametri di fertilità del suolo. Un'area che è stata fino ad ora poco considerata riguarda i modelli meccanicistici e predittivi dell'impatto dell'agricoltura sugli ecosistemi naturali. E' però difficile sviluppare questo settore scientifico senza aver prima condotto studi sulla dinamica delle popolazioni di funghi, batteri e insetti dannosi. Da considerare sono anche i cicli degli elementi della fertilità nel loro impatto sull'agricoltura, le ricerche sulla siccità e la desertificazione, e sulla fissazione biologica dell'azoto.

**Agire.** Da soluzioni tendenti a ridurre il supporto chimico all'agricoltura ci si attende che venga messo in atto un contenimento nell'aumento della quantità di azoto e fosforo utilizzati. L'agricoltura di precisione ha sviluppato un approccio tendente ad assicurare le risorse nutritive e la protezione della pianta senza incorrere in deficienze o eccessi. Una problematica centrale per la sostenibilità riguarda il miglioramento dell'efficienza della produzione ed uso delle derrate alimentari. Il controllo delle proteine nelle diete è una opzione, così come prevedere il consumo di più calorie e proteine vegetali. L'erosione del suolo può essere ridotta adottando pratiche di lavorazione minimale dei campi. Nel lungo periodo dovranno essere adottati, particolarmente per le monocolture, metodi di conservazione della fertilità dei suoli già da ora disponibili. Le malattie e gli attacchi degli insetti causano perdite produttive che possono raggiungere il 30 - 40%. Sarebbe perciò importante aumentare il ricorso ai biopesticidi, considerato che il loro uso supera appena l'1% del mercato globale. L'azione centrale da mettere in atto deve essere rivolta a soluzioni scientifiche radicali in grado di provvedere le singole componenti necessarie per lo sviluppo di nuovi sistemi agricoli: intensivi e nonostante questo sostenibili. E' qui che le nuove conoscenze relative ai genomi e alla genetica molecolare delle piante hanno la possibilità di contribuire allo sviluppo di nuovi sistemi colturali. Il miglioramento genetico convenzionale continuerà ad avere una funzione indispensabile in questo processo, ma di più può essere ottenuto ricorrendo a forme di miglioramento genetico molecolare.

## **5. Un approccio razionale ai problemi dell'agricoltura**

Antonio Saltini nella sua Storia delle scienze agrarie (1989), introduce il concetto della dualità dell'anima dell'agronomia, l'una empirica e la seconda razionale e meccanicistica. La seconda anima viene allo scoperto con il manifesto del 1840 di Justus Liebig e i paradigmi del tempo derivano da scoperte chimiche e biologiche. Il secolo tra la seconda metà dell'Ottocento e la prima metà del Novecento, che si apre con Charles Darwin e Gregory Mendel, introduce la biologia come sorgente di conoscenza scientifica ed arriva vicino alla decifrazione della natura del materiale ereditario. La seconda guerra mondiale conclude il periodo che ha visto nuove scienze manifestare le loro potenzialità, ma che fornisce pochi metodi scientifici per migliorare l'agricoltura, se è vero quanto legge il Senatore Giuseppe Medici nella prolusione inaugurale tenuta presso l'Accademia dei Georgofili nel 1970: "*Virgilio, duemila anni or sono, descrisse un tipo di agricoltura che, sostanzialmente, è quello da noi conosciuto fino alla seconda guerra mondiale. Ma, dopo l'ultimo conflitto, con la rivoluzione industriale comincia la grande trasformazione dell'agricoltura, oggi in pieno svolgimento*" (Medici, 1970). La seconda anima trae contributi agrotecnici dalla conoscenza dei principi e si impone solo negli ultimi sessant'anni: ha radici nella chimica, ma le prospettive di maggior respiro le vengono dalla biologia. Le basi scientifiche dell'agronomia si sono oggi estese a confini inimmaginabili. I modelli olistici vengono, così, sostituiti dalla conoscenza dei meccanismi molecolari che descrivono come l'informazione contenuta nel DNA determini la forma e le prestazioni degli organismi viventi (Fig. 1). Il modello che la ricerca affina considera, cioè, aspetti sempre più meccanicistici (Fig. 2).

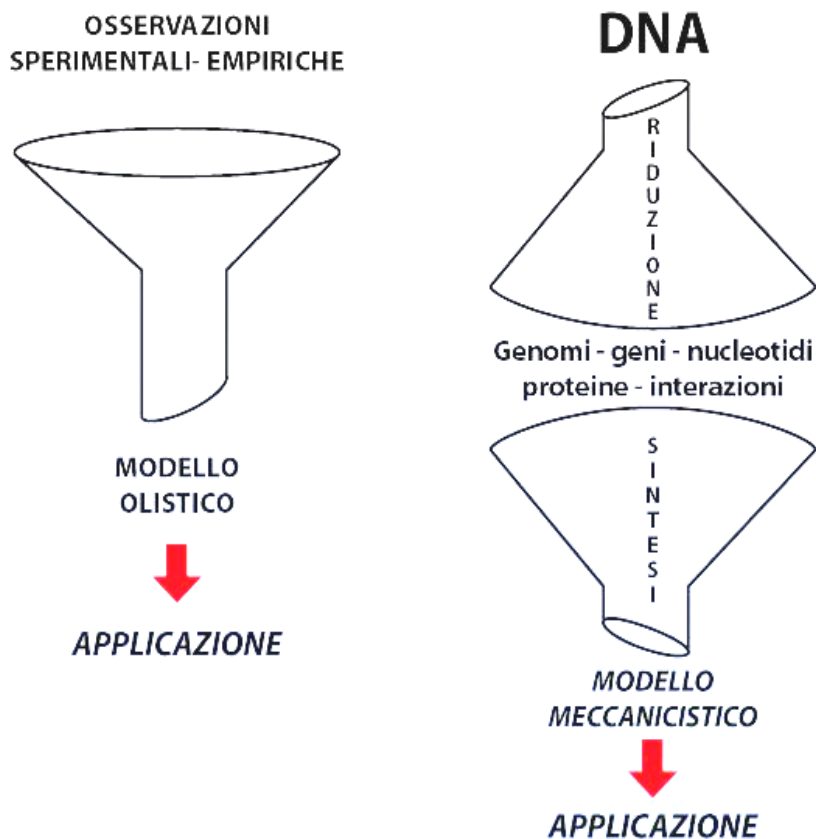


Figura1. La figura delinea i processi seguiti dalla ricerca agronomica negli ultimi tre secoli. **A**: sviluppo di agrotecniche, varietà migliorate e molecole agrochimiche a partire da informazioni empiriche ottenute con sperimentazioni di laboratorio e/o di campo; **B**: decodificazione dei genomi delle componenti vive del sistema agricolo, seguita dalla analisi di genomi, geni, nucleotidi nei geni, proteine codificate e loro interazioni; l'informazione viene utilizzata per chiarire i passaggi metabolici necessari alla produzione di modelli meccanicistici. La realizzazione dei modelli permette lo sviluppo di nuovi mezzi tecnici utilizzabili in agricoltura.



Figura 2. L'obiettivo molecolare dell'erbicida glifosate è l'enzima 5-enolpiruvilscichimato-3-P-sintetasi (EPSPS) coinvolto nella sintesi di alcuni aminoacidi: triptofano, tirosina e fenilalanina. L'erbicida interferisce con il sito dell'EPSPS dove si lega il suo substrato naturale, il fosfoenolpiruvato. Tutte le piante usano questa via metabolica per produrre gli aminoacidi aromatici e per questo il glifosate ha uno spettro erbicida molto ampio. La molecola è immobilizzata dal terreno dove viene degradata dai microrganismi. Piante OGM (a sinistra) che resistono al glifosate sintetizzano quantità più elevate di EPSPS (Gruys et al., 1999), o hanno una EPSPS con un sito di legame per il glifosate mutato (Dyer, 1994).

## 6. Quali i caratteri delle piante adatte a una agricoltura più sostenibile

Quanto trattato nelle sezioni che precedono, dovrebbe essere sufficiente a concludere che qualunque sistema agricolo sarà adottato nel futuro, questo oltre che più sostenibile degli attuali sarà anche altamente produttivo. La considerazione del ciclo dell'azoto da sola è sufficiente a provarlo. Dei 150 milioni di t di azoto che si aggiungono ai suoli agrari ogni anno, solo il 50% si ritrova nei prodotti raccolti; di questa quantità solo metà va al consumatore. I sistemi di reintegro dell'azoto a perdita zero sono però irrealistici da adottare, anche perché sosterebbero livelli di produzione simili a quelli delle agricolture pre-industriali. Il controllo dell'azoto nel letame, un uso più oculato dei rifiuti umani, strategie di *managment* più rispettose dell'ambiente e il contenuto proteico delle diete sono opzioni. Rimane la necessità di produrre ogni anno 110 milioni di t di N per sostenere almeno i livelli produttivi attuali. Soluzioni alternative a basso input di mezzi tecnici agricoli e a basso output di derrate sono cioè irrealistiche.

### 6.1 Produzione di biomassa e fotosintesi

Produrre energia in modo sostenibile è uno dei problemi da risolvere in questo secolo (Lynd et al, 2008). Se i biocarburanti faranno parte della soluzione (per esempio, la biomassa cellulosa attualmente costa attorno a 50 dollari/t, un valore superiore solo a quello del carbone) è ampiamente dibattuto e, da più parti, viene sollecitata una attenta analisi delle possibilità che in questo senso le piante possono offrire (Sheehan, 2009; Yuan et al, 2008). Ne deriva che l'attenzione alla efficienza biologica dei sistemi agricoli può diventare una componente primaria del futuro miglioramento genetico vegetale.

Al momento la discussione si concentra sulla scelta dell'organismo(i) su cui puntare: specie agrarie già in coltura o nuove piante (Stewart, 2007). E' certo che, in entrambi i casi, il ricorso ad adattamenti biotecnologici saranno necessari per massimizzare la produzione di biomassa, specialmente di quella cellulosa da trasformare in etanolo: un esempio evidente di questa necessità è che l'espressione in pianta di enzimi cellulolici codificati da organismi che degradano il legno può contribuire alla digestione successiva della cellulosa (Stewart, 2007). E' questa la ragione che suggerisce di ricorrere a piante non utilizzate per la produzione di cibo o di alimenti per animali, per evitare la possibilità di mescolare partite di prodotti destinati a diverse filiere produttive.

La seconda opzione sembra meno problematica e i modelli correnti riguardano il pioppo, il miscanto, il *Panicum virgatum* e l'*Arundo donax*. I caratteri delle piante da biomassa da considerare oggetto di miglioramento sono elencati di seguito (Hill et al, 2006):

- perennialismo (discusso più avanti) e maschiosterilità (Torney et al, 2007) che riduce l'investimento di materiali organici in organi riproduttivi;
- lignocellulosa. I polimeri che la formano sono emicellulose (attorno al 30%), cellulosa (44%) e lignina (26%); la lignina limita la degradazione enzimatica della biomassa. Almeno

due approcci biotecnologici sono in grado di ridurre il livello di lignina (He et al, 2003; Piquemal et al, 2002), anche se contestualmente vengono peggiorate le qualità agronomiche delle piante. Una soluzione è di esprimere un gene che codifica una cellulasi in pianta per migliorare il successivo processo digestivo (Biswas et al, 2006; Dai et al, 2005). Sono stati considerati anche altri interventi che modificano il livello di polimerizzazione della lignina (Weng et al, 2008);

- utilizzazione di geni che inducono resistenza agli stress biotici (si veda oltre) e abiotici, il caso dei geni *DREB-repeat binding factors (CBF)* (Umezawa et al, 2006);
- aumento dell'efficienza della fotosintesi (Zhu et al, 2008). L'efficienza massima (a 30 °C e a 380 ppm di CO<sub>2</sub>) è pari a 4,6% per le piante C3 e a 6% per le C4. Tuttavia, la conversione più elevata dell'energia luminosa relativa all'intero ciclo produttivo è del 2,4% (C3) e del 3,4% (C4). Il miglioramento dell'architettura della pianta può offrire soluzioni parziali, così come l'ottimizzazione della distribuzione dell'azoto tra le diverse proteine che partecipano al processo;
- riduzione della fotorespirazione. Per le piante C4 questo potrebbe portare all'innalzamento dell'efficienza massima di cattura della luce fino all'8% (Zhu et al, 2008). Nel cloroplasto di *Arabidopsis*, trasformato con 5 geni del batterio *E. coli* che partecipano alla via metabolica del glicolato, questo composto è convertito in acido glicerico. Questo riduce la fotorespirazione e le piante sviluppano una massa superiore (Kebeish et al 2007; Maurino e Peterhansel, 2010);
- sono descritte anche altre possibili modificazioni basate sulla ingegnerizzazione di processi che possono aumentare l'accumulo di biomassa (discusso dettagliatamente in Gonzales et al, 2009).

## 6.2 Eterosi e apomissia

L'eterosi descrive la superiorità di organismi ibridi nel confronto con quelli omozigoti della stessa specie (Hochholdinger e Hoecker, 2007). Le basi genetiche e molecolari dell'eterosi rimangono al momento da chiarire (Birchler et al, 2006). Spunti interessanti di indagine vengono però dalla constatazione che nel mais si osserva la perdita di colinearità tra linee pure a molti loci, quando non una perdita differenziata di larghi tratti di DNA cromosomico anche genico (Fu e Dooner, 2002; Morgante et al, 2005). Anche l'analisi dei trascrittomi sembra poter contribuire, almeno in mais, riso e *Arabidopsis*, a descrivere in modo più convincente alcuni aspetti molecolari che potrebbero spiegare l'eterosi (Huang et al, 2006; Guo et al, 2004; Vuylsteke et al, 2005). Uno studio molto recente ha individuato un singolo gene che sostiene, quando allo stato eterozigote, una forte manifestazione dell'eterosi in pomodoro (Krieger et al, 2010).

La massimizzazione del livello di eterosi non è possibile per tutte le piante agrarie: molte, infatti, hanno un carico genetico che impedisce lo sviluppo di linee pure, o comunque hanno organi sessuali e meccanismi che limitano la preparazione di seme ibrido. Tuttavia, copie di un genotipo possono essere ottenute per via vegetativa, o, per piante annuali, attraverso un meccanismo di apomissia, lo sviluppo di semi da cellule somatiche (Albertini et al, 2010). Uno degli approcci a questo problema si basa sull'analisi, in specie modello, di mutazioni meiotiche che in parte conducono all'acquisizione di competenza embriogenica da parte di cellule somatiche (Bicknell e Koltunow, 2004).

Un interessante studio di questo tipo è stato recentemente pubblicato (Olmedo-Monfil et al, 2010). In condizioni normali, nelle piante solo una delle 4 megaspore derivate dalla meiosi a partire dalla cellula madre delle megaspore (MMC) sopravvive. Questa produce i gameti femminili. Nei casi di piante apomittiche (Bicknell e Koltunow, 2004), si formano megaspore anche da cellule non ridotte in assenza di meiosi, megaspore che possono produrre gameti femminili. La proteina ARGONAUTE 9 (AGO9) di *Arabidopsis* restringe il campo di specificazione dei precursori del



gametofito femminile in modo dipendente dalla sua dose e secondo un processo di diffusione del relativo segnale. Nel mutante *ago9* recessivo si formano più megaspore (Olmedo-Monfil et al, 2010), e, soprattutto, le mutazioni di geni che contribuiscono al silenziamento genico hanno lo stesso fenotipo di *ago9*, indicando che il movimento di piccoli sRNA nelle cellule somatiche contigue a una megaspore è necessario per inibire la formazione di extra megaspore. Questi sRNA corrispondono a *transacting* siRNA (ta-siRNA; si veda oltre) che si possono muovere come molecole segnale (Chitwood et al, 2009; Schwab et al, 2009). Si formano dall'azione di una polimerasi dipendente da RNA (*RDR6*) che converte il loro mRNA precursore lineare in una struttura a doppio filamento, processo che necessita anche del gene *soppressore del silenziamento3* (*SGS3*; Chen, 2009). I mutanti recessivi di questi due ultimi geni hanno lo stesso fenotipo di *ago9*. I target primari del meccanismo di silenziamento messo in atto da AGO9 sono elementi trasponibili che codificano per piccoli sRNA. La loro inattivazione restringe la gametogenesi femminile a una sola MMC. Nei mutanti *ago9*, la gametogenesi femminile può iniziare anche da cellule somatiche, generando così semi apomittici. Lo studio indica che è ora possibile esplorare l'induzione di apomissia nelle piante agrarie a riproduzione sessuata, e, di conseguenza, fissare l'eterosi nelle progenie di singole piante con caratteri superiori.

### 6.3 Autoprotezione da malattie e insetti

Una riduzione nel carico ambientale è associabile alla coltivazione di piante che resistono a insetti e patogeni, con conseguente riduzione dell'impiego di agrochimici. Le malattie delle piante agrarie, d'altra parte, devono in qualche modo essere controllate, rappresentando esse un grave pericolo per la sicurezza alimentare del mondo (Strange e Scott, 2005). Varietà resistenti possono essere sviluppate con metodi di miglioramento genetico convenzionale, con selezione assistita da marcatori molecolari, che permettono di piramidizzare nello stesso genotipo fattori genetici multipli di resistenza (questo rallenta, quando non inibisce, l'evoluzione di nuove resistenze nel parassita), con metodi di selezione genomica, e ricorrendo alla transgenesi che si è dimostrata particolarmente efficace per il contenimento delle popolazioni di insetti dannosi. Una tecnologia OGM tra le più diffuse utilizza ad esempio i geni *Bt* codificanti per tossine attive contro diverse specie di insetti. Varietà di mais *Bt* resistenti alla piralide (*Ostrinia nubilalis*) sono in commercio dal 1996 (de Maagd et al. 1999). In Italia le perdite annue del raccolto di mais imputabili alla piralide variano dal 7% al 15% (Gianessi et al., 2003), e le rese di questi OGM sono, nelle aree soggette ad attacchi, superiori dal 6 al 15% a quelle di ibridi non transgenici trattati con insetticidi (Gianessi et al., 2003). La tecnologia Bt è stata applicata con successo anche alla difesa del cotone: varietà di cotone Bt hanno permesso una riduzione complessiva dei pesticidi fino al 70% rispetto a colture non-Bt, a fronte di rese superiori anche dell'80% (Qaim e Zilberman, 2003). In Cina, l'adozione del riso transgenico resistente agli insetti induce migliori rese e riduce dell'80% l'uso di pesticidi (Huang et al., 2005). Sempre in Cina, l'analisi delle popolazioni del verme del cotone *Helicoverpa armigera* indica che la coltivazione su 3 milioni di Ha di cotone transgenico Bt ha ridotto significativamente la presenza del parassita anche su altre colture, con conseguente risparmio di insetticidi (Wu et al 2008).

Contributi recenti alla possibilità di ottenere piante resistenti, se non addirittura immuni, all'attacco dei parassiti animali e microbici, vengono dall'analisi genomica della famiglia genica *NBS-LRR* che in tutti i vegetali codifica per i recettori del segnale proveniente dal parassita; dalla considerazione del ruolo che nei fenomeni di resistenza hanno gli RNA di piccole dimensioni (*smallRNA*; Padmanabhan et al, 2009; Lucioli et al, 2009); da nuove conoscenze sulla partecipazione dell'acido salicilico al segnale che potenzia la resistenza endogena delle piante (Loake e Grant, 2007); dalla scoperta e dall'analisi funzionale delle molecole secrete dai patogeni e che mediano i loro rapporti con la pianta (Ellis et al, 2009).

## 6.4 Perennialismo

Il perennialismo è tipico sia delle specie arboree che hanno la capacità di formare gemme dormienti sulle loro strutture aeree, sia di specie erbacee che riformano nuove strutture aeree ogni anno dalle gemme dormienti protette a livello del terreno (Rhode e Bhalerao, 2007). Per ragioni facilmente intuibili, una agricoltura basata su piante perenni offre vantaggi in termini di sostenibilità: riduce gli *input* energetici, crea condizioni per la conservazione invernale della microfauna e microflora associata alla pianta, permette, almeno nel caso delle specie arboree coltivate, il mantenimento di una flora consociata alla coltura nei periodi estivi.

La trasformazione di una specie annuale in una perenne è stata recentemente affrontata ricorrendo a diverse tecnologie. Nell'approccio di Borgato et al (2007), protoplasti di melanzana coltivata sono stati fusi con quelli di *Solanum marginatum*, una specie arborea. Dai calli ottenuti sono state rigenerate piante con caratteri intermedi a quelli delle due specie parentali, ovvero piante con ciclo vitale poliennale. E' interessante notare che i nuovi genotipi sono allotetraploidi con una fertilità sorprendentemente simile a quella delle specie parentali. La nuova specie ottenuta potrebbe convenientemente essere sviluppata per produrre varietà poliennali di melanzana da coltivare.

Il controllo del tempo di fioritura nella pianta modello *Arabidopsis* è a grandi linee descrivibile a livello molecolare (Mouradov et al., 2002; Ratcliffe e Riechmann, 2002), e le sue applicazioni al miglioramento genetico sono ampiamente previste e perseguite (Jung e Muller, 2009). I cammini metabolici interessati sono molteplici: il responso fotoperiodico; l'orologio circadiano che agisce come un oscillatore centrale; la risposta alla vernalizzazione; la via metabolica autonoma e quella delle gibberelline. Le vie metaboliche citate sono integrate e in parte convergenti nel regolare a valle l'espressione dei geni attivati o repressi. Ruoli nodali in questa integrazione di cammini metabolici giocano le proteine CRY2 (*Cryptochrome 2*), CO (*Costans*), FLC (*Flowering locus C*), FRI (*Frigida*), FT (*Flowering time*), SOC1 (*Suppressor of overexpression of CO1*), FPF1 (*Flowering promoting factor 1*), AP1 (*Apetala 1*) e LFY (*Leafy*). E' stato con i lavori di Melzer et al (2008) e di Wang et al (2009) che due di questi geni, che partecipano al determinismo della fioritura - rispettivamente *Soc1* e *FLC* o comunque loro ortologhi di specie perenni come *Arabidopsis montana* - si sono mostrati in grado di trasformare una specie erbacea annuale in una perenne.

## 6.5 La resistenza agli stress abiotici

La carenza di acqua per usi agricoli è un problema che affligge particolarmente le agricolture povere e marginali. Il sistema genetico-molecolare, attivo nell'induzione della resistenza alla siccità in piante agrarie e in piante modello (Bartels e Salamini, 2001), negli ultimi anni è stato particolarmente studiato (Moore et al, 2009; Reynolds e Tuberosa, 2008; Salekdeh et al, 2009). Recenti studi rivolti alla identificazione di geni coinvolti nel controllo della resistenza alla siccità hanno messo in evidenza il ruolo chiave di una classe di fattori trascrizionali noti come *CBF* (Zhang et al., 2004). Attraverso l'ingegnerizzazione di geni *CBF*, è stato ottenuto, in colza, pomodoro, frumento, mais e riso, un elevato grado di resistenza alla siccità (Zhang et al., 2004; Mendel Biotechnology, 2004).

## 7. L'arsenale metodologico

### 7.1. Sempre più biologia molecolare. Un esempio dalla protezione delle piante: la resistenza genetica ai potyvirus

I potyvirus consistono di un RNA a singolo filamento che ha la proteina VPg (codificata dal virus) legata al suo 5' e una coda polyA al 3'. La proteina VPg dei potyvirus si lega, nel test di lievito a doppio ibrido, al fattore traduzionale eucariotico f4 (eIF4E) delle piante, una proteina associata al ribosoma e che contribuisce all'allungamento della nascente catena proteica. Nel peperone, il fattore genetico *pvr-2* (che induce la resistenza al virus Y della patata e al virus TEV del tabacco), co-localizza a livello cromosomico con un locus genetico che ospita un gene ortologo a *eIF(iso)4E* di *Arabidopsis*. La considerazione delle mutazioni presenti in questo gene nelle linee resistenti ai potyvirus, rivela che si localizzano in due regioni del gene che codificano per regioni che nella struttura tridimensionale della proteina sono esposte all'interazione con altre proteine. La verifica del ruolo nell'indurre resistenza di queste mutazioni, fatta in peperone, pomodoro, lattuga e pisello, conferma che la genetica molecolare dei fattori ribosomali di allungamento dei polipeptidi offre realistiche possibilità applicative (Ruffel et al, 2002; Robaglia e Caranta, 2006).

### 7.2. MicroRNA e resistenza alla essiccazione

RNA di dimensioni ridotte (*small RNAs*) sono molecole di 19-27 nucleotidi che regolano negativamente diversi aspetti dello sviluppo delle piante (Chuck e O'Connor, 2010; Buhtz et al, 2008). Includono *microRNAs* (miRNA), *small interfering RNA* (siRNA), e *trans-acting siRNAs* (ta-siRNA). La loro genesi e i processi che la regolano sono stati approfonditi solo in tempi recenti (Small, 2007). Una recente acquisizione è che queste molecole sono mobili a diversi livelli: per esempio i ta-siRNA giocano un ruolo importante nel determinare l'abaxialità e l'adaxialità fogliare (Garcia, 2008; Emery et al, 2010); sono però ristretti nella loro diffusione da specifici meccanismi (Chuck e O'Connor, 2010) anche se possono trasportare il loro messaggio, in taluni casi, a lunga distanza (Chuck e O'Connor, 2010; Juarez et al, 2004). Dal punto di vista applicativo possono essere prodotti in pianta per inibire lo sviluppo di insetti dannosi (Gordon e Waterhouse, 2007; Mao et al, 2007) e per regolare importanti funzioni geniche come quelle che conducono alla resistenza agli stress abiotici (Sunkar et al, 2007; Hillbricht et al, 2008).

Nell'ultimo studio citato si dimostra che, dopo trasformazione con un opportuno promotore, un callo derivato *in vitro* dalla pianta *resurrection Craterostigma plantagineum* acquisisce la resistenza alla essiccazione in assenza dell'ormone acido abscissico. L'analisi del DNA contiguo all'inserzione del DNA di Agrobatterio (l'agente trasformante) ha permesso di isolare il gene *CDT-1* che appartiene a una famiglia di retrotrasposoni. Il gene non produce una proteina, ma invece sintetizza un ta-siRNA in grado di aprire la via metabolica che conduce alla resistenza all'essiccamento. Si dimostra che la trasposizione di questi retroelementi li ha progressivamente arricchiti nel genoma di *Craterostigma*, conferendole la capacità di disidratarsi e risorgere.

### 7.3. Mutazioni individuate in geni specifici o prodotte in geni specifici

Una tecnologia genetica nota con l'acronimo TILLING (Comai e Henikoff, 2006) permette di individuare, in una popolazione M2 di una specie agraria trattata con mutageni chimici o fisici, quelle famiglie che possiedono un allele mutato di un gene specifico. La tecnologia richiede la

conoscenza preliminare della sequenza del gene di interesse. Questo permette l'uso di oligonucleotidi gene-specifici utilizzati per amplificarlo via PCR. L'amplificato è attaccato da una endonucleasi che riconosce il DNA a due filamenti con un mancato appaiamento tra un nucleotide non mutato e uno mutato, procedendo a tagliarlo a questo sito. I prodotti della reazione nucleasica sono separati elettroforeticamente e la presenza di trascritti "corti" rivela quali delle famiglie considerate sono eterozigoti per una mutazione. L'analisi fenotipica delle famiglie che segregano per la mutazione permette di identificare il carattere mutato indotto dalla mutazione. La tecnologia è particolarmente utile negli studi di associazione di geni di interesse alla loro funzione in pianta. Ha molte potenzialità applicative consentendo applicazioni biotecnologiche dove sia necessario sopprimere una funzione genica; (es., la soppressione di un soppressore di una via metabolica di difesa da stress biotici o abiotici).

Una tecnica genetica introdotta molto recentemente permette di generare mutazioni a un gene di interesse, senza dover ricorrere all'analisi di famiglie mutagenizzate. Questo metodo può correggere un gene, del quale si conosce la sequenza, introducendo in una coltura di cellule singole un oligonucleotide sintetico a doppio filamento che possiede omologia a una regione del gene bersaglio. L'omologia si interrompe al nucleotide da mutagenizzare. Originariamente venivano proposti oligonucleotidi ibridi RNA-DNA (Gamper et al 2000) che stimolano il riparo riproduttivo del DNA della cellula in corrispondenza della formazione di strutture *triplex* dovute all'appaiamento dell'oligonucleotide (Christensen et al 2006; Knauert et al 2006). Sono stati registrati diversi brevetti che descrivono le applicazioni di questo metodo (es, Arntzen et al, 2006). Il metodo richiede che la pianta agraria a cui è applicato possa essere coltivata *in vitro* nella forma di coltura cellulare rigenerabile. Tra le piante rigenerate dopo il trattamento con oligonucleotidi gene specifici, una frazione possiede la mutazione allo stato eterozigote. Il risequenziamento delle linee mutate porta poi alla precisa descrizione della mutazione indotta. Diversi lavori pubblicati riportano che i meccanismi di riparo attivi sulle strutture *triplex* sono propri della cellula e come tali "naturali" (es, Igoucheva et al, 2006). E' stato segnalato che quando in cellule animali si blocca il sistema di riparo del DNA, il riparo è impossibile ma la ricombinazione tra il DNA residente e l'oligonucleotide può verificarsi (Metz et al, 2002), una osservazione che escluderebbe per la nuova tecnica la possibilità che gli oligonucleotidi somministrati in coltura vengano direttamente integrati nel DNA ospite. Quello che è chiaro è che i mutanti generati con il metodo descritto sono assolutamente identici a quelli che può produrre la mutagenesi naturale, e cioè che i fenotipi creati sono genocopie di quelli naturali. Come tali questi prodotti non dovrebbero essere assimilati ad OGM e quindi non sono oggetto della regolamentazione relativa. Il metodo ha una elevata valenza applicativa permettendo di indurre mutazioni in regione genomiche per le quali si conosce a priori il valore agronomico. Un metodo analogo è stato sviluppato a partire da costrutti che codificano per una nucleasi *zinc-finger* (Perez et al, 2008; Hockemeyer et al, 2009; Miller et al, 2007).

#### **7.4. Marcatori molecolari**

La tecnologia genetica è stata un fattore importante dell'evoluzione recente dell'agricoltura, sia nei paesi in via di sviluppo (Conway, 1997), sia in quelli sviluppati (Salamini, 1999a, b). La tecnologia si è risolta in un contributo epocale perché ha garantito rese superiori e piante più sane: perciò ha rimosso il fattore limitante che ha condizionato il progresso agronomico nel suo insieme, e cioè la disponibilità di genotipi con elevata resa potenziale. Questi hanno reso possibile ed utile intensificare le agrotecniche di sussidio, come concimazione, difesa e irrigazione. Nonostante i successi dei miglioratori vegetali siano stati associati a un uso razionale della scienza genetica, fino agli anni recenti le basi sperimentali del miglioramento genetico delle produzioni agrarie sono state essenzialmente empiriche.

Il nuovo approccio al miglioramento genetico si basa sulla possibilità di utilizzare, come marcatori molecolari, polimorfismi contigui nella molecola del DNA a loci genetici responsabili della determinazione di caratteri a variabilità discontinua e continua. L'adozione di questo approccio presuppone la disponibilità di dense mappe genetico-molecolari dove i loci marcatori sono rappresentati dai polimorfismi del DNA. Sono oggi disponibili molte tecniche in grado di rivelare i polimorfismi del DNA da utilizzare come posizioni di riferimento nello studio della variabilità genetica (Moose e Mumm, 2008; Dwivedi et al, 2007). I polimorfismi dovuti a differenze rappresentate da un solo nucleotide, indicati con l'acronimo SNP (Landegegn et al., 1998), *single nucleotide polymorphism*, sono tra i più utili e utilizzati. Gli SNP rappresentano, nell'uomo, l'80% di tutta la variazione genetica. Nella barbabietola sono ritrovabili, in confronti casuali tra linee pure, in misura di uno ogni 74 nucleotidi (Schneider et al., 2001). Una frequenza dello stesso ordine è riportata per il mais (Ching et al., 2002). Gli SNP si adattano facilmente all'analisi robotizzata (Rafalski, 2002).

Una estensione dell'uso dei marcatori riguarda la comprensione della variabilità genetica di tipo continuo. L'analisi di questa variabilità, quando è assistita da marcatori molecolari, permette di assegnare a specifiche regioni cromosomiche gli effetti genici (QTL) che influenzano la variabilità continua (Cooper et al, 2009; Asins, 2002). Dal punto di vista concettuale, entrambi gli alleli di un gene possono essere funzionali. Se essi, tuttavia, sono responsabili del ritrovamento di un QTL, si devono differenziare per livello di espressione o per proprietà molecolari specifiche. Nella misura in cui questo è vero, viene definito un principio importante: un organismo può rispondere alla selezione quando per uno o più caratteri può essere definita l'esistenza di QTL, e cioè quando nelle popolazioni dell'organismo alcuni geni hanno alleli sufficientemente diversi da essere diversificati in base a esperimenti di selezione fenotipica. In questo senso i loci genetici che controllano caratteri ad eredità continua definiscono funzioni geniche critiche nel processo di miglioramento di un organismo.

La disponibilità di una larga batteria di marcatori predittivi di importanti caratteri rende possibile la loro utilizzazione in piani di selezione assistita, che possono anche includere la piramidizzazione di azioni multigeniche favorevoli all'espressione dello stesso carattere (Wenzel, 2007; Dwivedi et al, 2007). La selezione assistita (MAS) fa anche uso di marcatori che, pur non rivelando polimorfismi al gene responsabile del QTL, sono strettamente concatenati allo stesso, e quindi utilizzabili entro popolazioni segreganti per selezionarlo (Ribaut et al, 2010). Procedure MAS basate su un numero di marcatori SNP sufficiente per coprire l'intero genoma di una specie, e che fanno uso di chip molecolari o di altri metodi altamente robotizzati, dovrebbero, in un futuro vicino, contribuire a trasformare la selezione genetica da un processo empirico in una attività con solide basi predittive.

La possibilità aperta dai recenti sviluppi delle tecniche di sequenziamento del DNA e di tipizzazione genotipica via SNP, permette di valutare l'associazione tra geni specifici e un carattere rilevabile fenotipicamente (Rafalski, 2010; Mackay e Powell, 2006; Cavanagh et al, 2008). Questo nuovo paradigma del miglioramento genetico si origina dalla constatazione che alleli di marcatori contigui possono risultare preferenzialmente concatenati (*linkage disequilibrium*, LD), una situazione che rende possibile valutare anche la loro associazione con i geni che sostengono un fenotipo particolare in popolazioni commerciali o in collezioni di varietà. Sono allo scopo disponibili piattaforme robotizzate adatte alla descrizione fenotipica di un numero elevato di piante (Montes et al, 2007). Il nuovo approccio è adottato anche in specie di interesse agrario dove gli esperimenti di associazione permettono di restringere la localizzazione di un QTL a regioni cromosomiche di 1-3 cM (Morgante e Salamini, 2003).

Gli esperimenti di mappatura dei QTL possono essere estesi fino al clonaggio del locus genetico responsabile del QTL (Morgante e Salamini, 2003). Alcuni di questi geni già clonati codificano per

fattori di trascrizione genica, altri partecipano a vie metaboliche, ed altri a vie di trasmissione del segnale di attivazione o repressione genica. Quando questo tipo di informazione diventa disponibile, i geni clonati possono essere utilizzati come marcatori per assistere la selezione di individui con caratteristiche superiori, o essere utilizzati per creare varietà GM.

## 7.5. La genomica

La genomica si preoccupa di caratterizzare tutta l'informazione contenuta nel DNA di un organismo. Per estrarre questa informazione vengono utilizzate tecnologie robotizzate e, nei casi migliori, le operazioni necessarie sono organizzate in piattaforme cosiddette omiche (genomiche, trascrittomiche, metabolomiche, epigenetiche, di *knock-out* genico per produrre tutte le varianti geniche possibili di un organismo, della individuazione di promotori, di bioinformatica).

I progetti di genomica che fanno uso delle procedure menzionate e che hanno per obiettivo uno specifico organismo, possono riguardare, per esempio, il sequenziamento di tutti i geni espressi o dell'intero genoma; l'analisi trascrizionale di tutti i geni attivi in diverse condizioni ambientali; il sequenziamento del DNA contiguo ad elementi inseriti nel genoma in posizioni che generano mutazioni. Tra le piante è disponibile la sequenza dell'intero genoma di *Arabidopsis* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), del riso (Goff et al, 2002; Yu et al, 2002), della vite (Zharkikh et al, 2008; Jaillon et al, 2007; Velasco et al, 2007), del pioppo (Tuskan, 2006), della papaia (Ming et al, 2008), del cetriolo (Huang et al, 2009), del mais (Schnable et al, 2009), della soia (Schmutz et al, 2010) e del melo (IASMA, 2010, comm. pers.).

Le informazioni che si ottengono dalla genomica vengono già oggi applicate allo sviluppo di interessanti prodotti tecnici per l'agricoltura. Gli schemi d'uso delle procedure genomiche sono svariati, essendo possibile combinare diverse metodiche in successione per raggiungere lo scopo specifico dell'esperimento (Yano e Tuberosa, 2009; Flavell, 2010; Friesen e von Wetttemberg, 2010; Stratton, 2008; Waugh et al, 2009; Salamini, 2002). Un particolare significato ha assunto l'analisi genomica rivolta alla descrizione, utilizzazione e conservazione della biodiversità delle piante agrarie (de Meaux e Koornneef, 2008; Tang et al, 2008; Tang et al, 2009; Glazsmann et al, 2010).

Il documento del 2004 del Science Advisory Council, European Academies (EASAC, 2004), indica, per i prossimi 10-20 anni, le seguenti opportunità che la genomica può offrire:

- miglioramento genetico basato su acquisizioni molecolari;
- conoscenza molecolare approfondita di perennialismo, apomissia, riproduzione vegetativa e sessuale, implicazioni molecolari dell'addomesticamento delle piante, architettura della pianta, sviluppo del seme e del fiore, acclimatamento, adattamento all'ambiente;
- riduzione del livello di sostanze tossiche e antimutrizionali, come alcaloidi nei lupini, lectine nei fagioli, acido fitico nei legumi;
- miglioramento del contenuto in micronutrienti, come tocoferoli, acido folico, e degli aminoacidi essenziali;
- aumento dell'efficienza di piante "orfane", come specie arboree da foresta o da frutto, affrontando i processi metabolici inerenti alla produzione del legno, riducendo lo stato giovanile della pianta, sviluppando varietà nuove.

Lo stesso rapporto raccomanda l'uso della genomica per assistere l'ottenimento di varietà adatte a sistemi agricoli sostenibili.

## 7.6 Organismi geneticamente modificati, OGM

Il ricorso alla tecnologia dei transgeni è stato adottato negli ultimi 14 anni da contadini che, nel periodo, hanno coltivato in totale 950 milioni di Ha. Nel 2009, la superficie coltivata con OGM è stata di 134 milioni di Ha e ha interessato 14 milioni di agricoltori. Il cotone OGM occupa il 50% delle superfici mondiali dedicate a questa coltura (il 75% in India), la soia il 75, il mais il 25. Nel

2009 la Cina ha approvato il riso Bt e il mais che esprime una fitasi in grado di degradare i polimeri che contengono fosforo. L'India sta decidendo se autorizzare una melanzana Bt per la produzione di bacche per uso umano. Le Filippine prevedono per il 2012 la coltivazione del riso ad elevato contenuto di carotene, per lo stesso anno gli Stati Uniti quella dei mais resistenti alla siccità e per il 2016 la coltivazione del frumento con una superiore efficienza nell'uso dell'azoto (James, 2009).

La discussione sugli OGM può riguardare anche la domanda se gli sviluppi biotecnologici che prevedono l'uso di OGM debbano seriamente essere accettati come contributo al miglioramento dell'ecologia delle coltivazioni. Almeno due aspetti possono essere discussi in una ottica positiva. Il primo riguarda il ricorso agli OGM per decontaminare i suoli (Ron, 2007; Dowling e Doty, 2009). Il secondo considera l'effetto benefico degli OGM sulla riduzione dell'impatto ambientale dell'agricoltura.

La *phytoremediation* o fitorimedio utilizza le piante per decontaminare i terreni da metalli, idrocarburi, esplosivi e altre sostanze bio-incompatibili. Le piante naturalmente in grado di detecontaminare suoli anomali rappresentano un potenziale target dell'ingegneria genetica in quanto, individuati e clonati i geni responsabili per la loro resistenza alla tossicità dei metalli, è possibile trasferirli eventualmente a specie che producono una maggiore quantità di biomassa. Un approccio più biotecnologico si rivolge alla produzione di piante transgeniche che, nel caso della detossificazione del cadmio, sono varietà di *Brassica juncea* che esprimono nella radice e nel germoglio i geni che codificano per una glutatione sintasi e per la gamma-glutamyl cisteina sintetasi (Zhu et al., 1999 a e b). Questi OGM accumulano cadmio grazie alla produzione di fitochelatine, peptidi con alta affinità per lo ione metallico e in grado di chelare il  $Cd^{2+}$  sequestrandolo dall'ambiente. Il metallo accumulato viene rimosso insieme alla coltura alla fine del ciclo vegetativo. Anche il fitorimedio di terreni inquinati da metilmercurio ha un interesse particolare perché il bioaccumulo di questo metallo è una possibilità molto realistica. Due enzimi, la organomercurio-liasi (MerB) e la mercurio reduttasi (MerA), clonati da batteri, sono in grado di convertire il metilmercurio a mercurio elementare Hg(0), meno tossico e che diffonde nell'aria. Piante ingegnerizzate con entrambi i geni estraggono i composti organici del mercurio e traspirano mercurio elementare Hg(0) nell'atmosfera (Kramer, 2005; Ruiz e Daniell, 2009).

Il contributo degli OGM alla sostenibilità dei sistemi agricoli è stato proposto e discusso a livelli diversi. Per esempio, il ricorso a piante ingegnerizzate per resistenza agli erbicidi elimina l'uso dei diserbanti in pre-emergenza, riducendo così la necessità delle arature (Wolfenbarger e Phifer, 2000). Sensibili benefici agrotecnici sono segnalati in Argentina a seguito dell'adozione della soia RoundupReady® resistente al *glyphosate* (FAO, 2004). L'accessibilità ai geni che degradano gli erbicidi, inoltre, allarga lo spettro delle molecole che si possono sviluppare, contribuendo così alla scelta di composti a bassa persistenza ambientale (Culpepper e York, 1998; Roberts et al, 1998). In generale, le varietà GM che contribuiscono all'aumento della produzione hanno una evidente valenza per la sicurezza degli approvvigionamenti di *commodities* agricole. Da questo punto di vista è facile concludere che il ricorso a varietà che si autodifendono da insetti e da parassiti microbici ha evidenti vantaggi ecologici.

Anche la introduzione di genotipi con superiore qualità e valore salutistico dei prodotti o della attitudine alla loro trasformazione, ha la possibilità di ridurre il consumo di prodotti animali, e quindi di contribuire a risparmiare parti delle superfici dedicate alla coltivazione dei cereali. L'uso della transgenosi vegetale si offre, in questo senso, come importante possibilità per le produzioni alimentari superiori. Gli acidi grassi polinsaturi a lunga catena con 20 o 22 atomi di carbonio (C20- o C22-LCPUFA) sono essenziali per la salute umana. Ad esempio l'acido docosaesaenoico (DHA, C22) facilita il corretto sviluppo del sistema nervoso (Domergue et al, 2005). L'uomo non sintetizza *de novo* queste sostanze e solo l'assunzione di DHA e acido eicosapentaenoico (EPA, C20) soddisfa le sue richieste nutrizionali. Il salmone è una fonte naturale di LCPUFA (21,7% degli acidi grassi

totali; Domergue et al, 2005) ma richiede farine (45%) e olio (25%) ottenuti da pesce pescato (Naylor et al, 1998). L'impoverimento delle risorse ittiche naturali e l'impatto ambientale dell'acquacoltura stimolano approcci alternativi per la produzione di LCPUFA per il consumo umano, ma anche per la preparazione di mangimi animali. L'ottenimento di ceppi di soia GM che utilizzano i precursori C18 degli LCPUFA - l'acido linoleico e l'acido  $\alpha$ -linolenico, sintetizzati dalle piante superiori - permette di produrre LCPUFA fino al 35,1% degli acidi grassi totali (Domergue et al, 2005; Graham et al, 2007).

Il Golden Rice 2 rappresenta un successo nell'applicazione dell'ingegneria metabolica basata sul trasferimento di una intera via metabolica (Naqvi et al, 2009). Nell'uomo la deficienza di vitamina A espone al rischio di cecità e di depressione del sistema immunitario, un problema per 250 milioni di adulti e bambini umani (Grusak, 2005). Le piante sono in grado di sintetizzare il  $\beta$ -carotene (o pro-vitamina A) che viene poi convertito in vitamina attiva. In Asia, la carenza di vitamina A deriva da una dieta a base di riso, la cui parte commestibile del seme è priva di  $\beta$ -carotene (Paine et al, 2005). Attraverso l'ingegnerizzazione di due enzimi derivanti rispettivamente dal bucaneeve e dal batterio *Erwinia uredovora*, è stato possibile ottenere l'accumulo, nell'endosperma di riso, di elevate concentrazioni di  $\beta$ -carotene (Paine et al, 2005). Esempi recenti di applicazione della tecnologia trasgenica alla qualità delle piante agrarie riguardano la fortificazione del riso con acido folico (Storozhenko et al, 2007), le farine a basso contenuto di acido fitico (Shi et al, 2007; Raboy, 2007), l'ingegnerizzazione delle vie metaboliche degli antociani (Butelli et al, 2008; Tanaka e Ohmura, 2008), la rimozione di allergeni presenti in prodotti vegetali (Singh e Balla, 2008).

Il rapporto della Commissione congiunta delle Accademie Nazionali dei Lincei e delle Scienze "Le biotecnologie vegetali e le varietà GM" (2003) riassume, anche nei dettagli, le ragioni a favore dell'adozione di questa tecnologia e le precauzioni da considerare nel valutare l'introduzione in coltura delle varietà GM, precauzioni che riguardano aspetti nutrizionali e l'interazione degli OGM con l'ambiente. In Europa, dove la tecnologia OGM è in pratica rifiutata per motivi sociali e mediatici, il tentativo di creare varietà di piante coltivate con gli stessi caratteri migliorati presenti negli OGM ha stimolato da una parte lo sviluppo di metodi alternativi, dall'altra la proposta di metodi di contenimento dei geni introdotti nel genoma vegetale (Hills et al, 2007; Ow, 2007; Lutz e Maliga, 2007). A uno dei metodi alternativi si è accennato facendo riferimento alla mutagenizzazione di specifici gene in posizioni nucleotidiche tali da ottenere effetti fenotipici rilevanti. La tecnologia è comunque sotto scrutinio regolatorio, e l'impressione è che possa essere considerata non soggetta alla regolamentazione in atto per i transgeni. Un approccio alternativo a quello OGM è basato sulla trasformazione genetica ed è noto come "intragenico" o "cisgenico" (Rommens et al, 2007; Schouten et al, 2008). Corrisponde al trasferimento di geni ottenibili solo da specie sessualmente compatibili con la pianta agraria da modificare. Il metodo offre il vantaggio di accelerare i tempi di introduzione in una specie coltivata di geni utili, evitando di trasferire, come avviene nelle introgressioni da incrocio interspecifico, estesi frammenti di DNA che possono ospitare azioni geniche inutili o dannose. La versione "intragenico" ammette la combinazione di promotori con geni che nel donatore hanno promotori diversi, ma i nuovi promotori devono essere scelti da una pianta sessualmente compatibile con quella da trasformare. Una ulteriore possibilità può riguardare l'uso di portainnesti OGM in grado di meglio adattarsi alle condizioni dei terreni agrari, o che eventualmente possono produrre segnali (es. ta-siRNA) che si diffondono nella parte aerea non OGM.

## CONCLUSIONI



L'agricoltura ha effetti evidenti sull'ambiente: quanto più terra è arata e tanto meno è disponibile per gli ecosistemi naturali. Il problema è di valutare quali effetti irreversibili sono determinati dalle agrotecniche correnti, e quale priorità hanno la conservazione della biodiversità del pianeta e la sostenibilità dei sistemi agrari nei confronti della produzione di cibo (Pinstrup-Andersen et al, 1997; Vasil, 1998; Salamini, 2000). Quando la discussione affronta questi temi (Green et al, 2005; Balmford et al, 2005), fa riferimento a i) una agricoltura *wildlife-friendly* e ii) al risparmio dei suoli agrari contenendo la messa in coltura di nuove terre, e quindi privilegiando l'intensificazione colturale. Il primo approccio riduce l'impatto dell'agricoltura attraverso pratiche estensive che minimizzano l'uso e gli effetti di fertilizzanti e pesticidi sugli organismi che non sono i target delle molecole agrochimiche, tendendo alla conservazione della biodiversità nei terreni agrari. La seconda proposta sostiene l'adozione di pratiche di agricoltura sempre più intensiva per massimizzare le rese, riducendo la messa in coltura nuovi suoli. A supporto della seconda soluzione vengono spesso commentati i dati FAO e i bassi risultati produttivi ottenuti dalle agricolture a bassa intensità (Avery, 2001; Gabriel et al, 2010; ).

Una possibilità reale è di insistere su di un'intensificazione soffice, ma altamente produttiva dell'agricoltura. Soprattutto è necessario ridiscutere ogni singola proposta, sia essa chimica, biotecnologica o agrotecnica alla luce della conoscenza biologica, che per esempio permette di accertare con affidabili misure molecolari la biodiversità che ancora insiste nei sistemi agrari. Infatti, la rivoluzione agricola a cui il senatore Medici si riferiva, ha modificato radicalmente lo stato di equilibrio tra biotopi agrari ed ecosistemi naturali, equilibrio raggiunto dopo che dal neolitico l'agricoltura mesopotamica era stata introdotta anche in Europa (Salamini et al, 2002b). Quella dei millenni che precedono l'era moderna era un'agricoltura autosufficiente per le necessità energetiche; era anche sostenibile, almeno nel garantire produzioni annuali di 0,5-1,5 t/ha di derrate alimentari (Saltini, 1989). Le rese dei campi nel ventesimo secolo hanno andamenti sempre crescenti. Questo già per sé denuncerebbe la condizione temporale di disequilibrio degli output agricoli, a loro volta, probabilmente, stimolati molto dalle dinamiche di mercato e meno da considerazioni sulla sostenibilità degli attuali sistemi colturali. E' per l'esistenza di questo disequilibrio che la questione agraria - nel passato oggetto di interesse solo per minoranze di settore e quasi sconosciuta al grande pubblico - si impone oggi all'attenzione dei media e della politica, soprattutto per le sue implicazioni ecologiche. Per questo assume una rilevanza centrale nei modelli che presentano le linee di sviluppo futuro di comunità umane organizzate in sistemi sociali complessi. Da quest'ultimo punto di vista - e mentre nei paesi del sud del pianeta ancora si deve discutere di vero e proprio sviluppo rurale - nelle società sviluppate le dinamiche sociali dei comprensori agricoli vengono integrate nei tentativi nazionali, o europei, o globali, di raggiungere livelli di consumi sostenibili, come premessa per forzare il raggiungimento di analoghi equilibri tra intensificazione agricola e esigenze ecologiche.

Di certo la sostenibilità agricola dovrà essere raggiunta in questo secolo assieme alla stabilizzazione delle popolazioni mondiali e dei livelli dei consumi. Sono stati proposti modelli anche pessimistici su come questa sostenibilità verrà realizzata. Una parte delle incertezze potrà essere eliminata da una razionale capacità di condurre ricerca agraria. La strada verso la sostenibilità non sarà comunque caratterizzata dal ritorno a forme di agricoltura tipiche dei tempi pre-industriali (Avery, 1994). In confronto con il 1967, l'area dedicata alla coltivazione del mais si è espansa di ulteriori 30 milioni di ettari. Se la produzione per unità di terra fosse rimasta al livello del 1967, sarebbe stato necessario disporre di ulteriori 446 milioni di ettari da ricavare dall'aratura di terre vergini. Questo per sottolineare che le agricolture a bassa resa richiedono la messa a coltura di nuova terra favorendo l'occupazione di nuovi ecosistemi naturali con tutte le negatività associate. In Europa l'agricoltura è particolarmente integrata nel sistema di mercato che le impone precisi vincoli finanziari; questa situazione complica, almeno in parte, lo sviluppo di sistemi agricoli sostenibili. Tuttavia, se si considera che circa il 40% della produzione di cereali europea è usato per alimentare animali, è ragionevole credere che la politica agricola del continente abbia sufficienti opzioni per sviluppare nuovi sistemi agricoli. Il problema è di far valere tutte le possibili opzioni: la genetica

agraria nei suoi sviluppi molecolari applicativi rimane, malgrado i tempi, i media e le politiche nazionali e internazionali, un grande richiamo alla speranza.

## **9. Riferimenti bibliografici**