

Tecniche di Miglioramento Genetico Vegetale

Una valutazione dal punto di vista dell'agricoltura biologica



2019

Con il contributo di:

Questo dossier è l'edizione italiana di un lavoro pubblicato nel 2015 dall'Istituto per la ricerca sull'agricoltura biologica (Forschungseinrichtungen zur biologischen Landwirtschaft, FiBL) di Svizzera e Germania, tradotto, rivisto e aggiornato a cura di Rete Semi Rurali.

Nel contesto di un sempre vivo dibattito sulle tecniche di ingegneria genetica e la loro compatibilità con le pratiche dell'agricoltura biologica, questo dossier intende dare una visione d'insieme su tutti i metodi di miglioramento genetico ad oggi applicabili (ed applicati) alle piante coltivate, valutandone la coerenza o meno con i principi fondanti l'agricoltura biologica. In questo senso, spera di fornire agli operatori del settore una comprensione di base dei vari strumenti ed approcci permettendo di esprimere una critica informata e costruttiva su ognuno di essi nel contesto dell'agricoltura biologica.

La sezione introduttiva inquadra il contesto storico, tecnico e legale tanto dell'agricoltura biologica come del miglioramento genetico vegetale e della produzione sementiera. Si evidenziano i motivi per cui è opportuno, per non dire necessario, dedicare programmi di miglioramento genetico specifici all'agricoltura biologica, che usino approcci rispettosi dell'integrità fisica e funzionale di ogni parte della pianta e massimizzino la diversità genetica della specie. Si descrive la rapida evoluzione subita nell'ultimo secolo dal miglioramento genetico: da attività strettamente connessa alla pratica produttiva e pertanto nelle mani degli stessi agricoltori è oggi un'attività quasi totalmente separata dai campi dove si produce il cibo che mangiamo e, a livello globale, concentrata nelle mani di poche ditte spesso multi-nazionali. Anche questi aspetti vengono valutati criticamente alla luce dell'importanza, nel biologico, di ricondurre la selezione e l'adattamento delle piante ad una dimensione più locale e partecipata.

Le sezioni successive del libretto descrivono le tecniche ad oggi disponibili nell'ambito di ciascuno degli stadi in cui si articola il lavoro di ricerca per produrre nuove varietà, dalla definizione degli obiettivi, passando dalla creazione di diversità (per esempio tramite incrocio), la selezione durante varie generazioni, ed infine arrivando alla scelta delle piante migliori da provare in campo e successivamente propagare in modo da poter iniziare a produrre seme per il mercato. E' già intuitivo che fin dalle primissime fasi (in primis la definizione degli obiettivi), un programma di selezione varietale per un modello agricolo alternativo - biologico, biodinamico- dovrà differire anche sostanzialmente da un programma dedicato ad un'agricoltura di grande scala e industriale.

Le tecniche descritte includono quelle più "tradizionali" fino alle più recenti, tra cui le controverse nuove tecnologie per la selezione vegetale o "nuovi OGM" (New Plant Breeding Techniques – NPBT). Si descrivono anche i diversi tipi di varietà che possono essere ottenute con i diversi metodi, soffermandosi sulla diversità genetica che caratterizza ogni tipo e la possibilità o meno di usarle per ulteriori processi di selezione o riproduzione.

L'ultima sezione riporta un documento programmatico prodotto dal Consorzio Europeo per il Miglioramento Genetico Biologico (ECO-PB), di cui Rete Semi Rurali è socio, nel quale si delineano i criteri tecnici ed etici secondo i quali valutare gli approcci al miglioramento genetico e la produzione varietale in agricoltura biologica. L'esistenza di un documento formale dà autorevolezza a programmi di miglioramento dedicati specificamente al biologico, fornendo un solido e condiviso terreno d'azione a selezionatori e agricoltori che operano in questo settore.

Ci auguriamo che a partire da una maggior comprensione della diversificata gamma di strumenti ed approcci al miglioramento genetico, possa scaturire un dibattito informato e non meramente ideologico sui metodi di ricerca e sviluppo più appropriati e coerenti nel contesto di sistemi agricoli diversificati e sostenibili.

Indice dei contenuti

Introduzione	6	Selezione	33
Perchè c'è bisogno di un miglioramento genetico (specifico) per il bio?	8	Tecniche a livello di pianta intera	33
Requisiti per l'agricoltura biologica	8	Selezione fenotipica in campo	33
Concentrazione del mercato sementiero	9	Shuttle breeding	33
		Cambio dell'epoca di semina	34
		Metodo spiga-fila	34
		Reincrocio o test cross	35
Inquadramento legale	11	Selezione fenotipica in condizioni controllate	35
La protezione delle varietà vegetali	11	Selezione per la qualità tecnologica	36
I brevetti	12	Selezione di caratteri organolettici	36
		Selezione tramite analisi di immagini	37
Organismi geneticamente modificati	13	Tecniche a livello della cellula o dei tessuti	37
		Selezione <i>in vitro</i>	37
Strategie per ottimizzare la selezione varietale	13	Tecniche a livello del DNA e dei prodotti genici	38
		Selezione assistita da marcatori molecolari (MAS)	38
Tecniche per la selezione e la propagazione delle piante	15	Proteomica/Metabolomica	39
Generazione di variabilità genetica	17	Propagazione	40
Tecniche a livello di pianta intera	17	Tecniche di propagazione a livello di pianta intera	40
Incrocio mirato all'interno di una specie	17	Propagazione sessuale o generativa	40
Incrocio inter-specifico	18	Propagazione vegetativa	41
Incrocio ponte	19	Apomissia	41
Mutagenesi indotta	19	Tecniche a livello di cellula o tessuto	42
TILLING (lesioni locali mirate indotte nel genoma)	20	Propagazione <i>in vitro</i>	42
Poliploidizzazione	21	Tipi di varietà	43
Maschio-sterilità citoplasmatica (CMS)	22	Varietà clonali	43
Tecniche a livello della cellula o dei tessuti	23	Linee pure	44
Culture di ovario ed embrione	23	Popolazioni di incroci o "evolutive"	44
Piante doppi aploidi	23	Varietà a impollinazione aperta	45
Fusione cellulare tramite protoplasti	24	Varietà derivate da incroci multipli	45
Fusione cellulare tramite citoplasti	25	Ibridi	46
		Ibridi con effetto xenia	47
Tecniche a livello del DNA	26	Criteri per la valutazione delle tecniche di miglioramento genetico	48
Trasferimento di geni per la produzione di piante transgeniche	26	Bibliografia	50
Cis-genesi	27	Nota tipografica	51
Trasformazione plasmidica	27		
Genome editing - Mutagenesi sito-specifica indotta da nucleasi a dita di zinco (ZFN)	28		
Genome editing - TALEN	28		
Genome editing - Mutagenesi oligonucleotide-diretta	29		
Genome editing - CRISPR	29		
Silenziamento genico – interferenza del RNA (RNAi)	30		
Selezione inversa	31		
Trasformazione tramite mini-cromosomi	32		
Biologia di sintesi	32		

Glossario

Alleli: le due o più forme alternative dello stesso gene che si trovano nella stessa posizione su ciascun cromosoma omologo (genico). Gli alleli controllano lo stesso carattere ma possono portare a prodotti quantitativamente o qualitativamente diversi.

Aminoacido: unità costitutive delle proteine, composte da un gruppo funzionale amminico (basico, $-NH_2$) ed uno carbossilico (acido, $-COOH$).

Antere: (dal greco *antheros*, 'fiorito') la parte terminale degli stami, gli organi sessuali maschili delle Angiosperme (le piante più evolute, con fiore vero e seme protetto).

Attitudine combinatoria: l'attitudine combinatoria generale (GCA) indica la performance media di una certa linea pura in una serie di combinazioni ibride, mentre l'attitudine combinatoria specifica (SCA) esprime la performance di una specifica combinazione di linee pure in un incrocio specifico.

Callo: massa disorganizzata di grandi cellule pochissimo specializzate che si forma per accrescimento e proliferazione cellulare (in natura generalmente allo scopo di cicatrizzare una eventuale ferita di organo vegetale, sulla superficie della lesione).

Carattere (monogenico o poligenico): una qualsiasi caratteristica di un organismo determinata dall'informazione genetica contenuta in uno (monogenico) o più (poligenico) geni nello stesso organismo. Non va confuso con il fenotipo che non indica il carattere ma piuttosto lo stato in cui questo si trova.

Cassetta genica: un elemento genetico mobile che contiene un gene ed un sito di ricombinazione.

Citoplasma: porzione della cellula delimitata dalla membrana plasmatica e comprendente tutti i costituenti protoplasmatici (organuli cellulari, matrice citoplasmatica e citoscheletro) tranne il nucleo.

Cloroplasti: plastidio contenente clorofilla presente nel citoplasma delle cellule vegetali esposte al sole; nelle sue membrane interne (tilacoidi) avvengono le reazioni di assorbimento della luce tipiche della fotosintesi.

Cromosoma: la struttura con cui, durante il processo riproduttivo (meiosi) della cellula, il DNA, dopo essersi duplicato, si compatta grazie a specifiche proteine e viene trasmesso alle cellule figlie. Nelle cellule somatiche (diploidi) ogni cromosoma è presente in due copie di cromosomi omologhi, uno di origine paterna e uno di origine materna.

Crossing-over: l'importante meccanismo di ricombinazione del materiale genetico proveniente dai due genitori, che permette una maggiore varietà nei prodotti della riproduzione

sessuata. Tramite la ricombinazione, che riguarda il DNA, a partire da un genotipo, si ottengono nuove combinazioni di alleli rispetto a quelle iniziali.

Cultivar: termine col quale in agronomia si indica una varietà di pianta coltivata ottenuta tramite miglioramento genetico, che riassume un insieme di specifici caratteri morfologici, fisiologici, agronomici e merceologici di particolare interesse e trasmissibili con la propagazione, sia per seme sia per parti di pianta.

DNA: (acido desossiribonucleico o deossiribonucleico) un acido nucleico che contiene le informazioni genetiche necessarie alla sintesi di RNA e proteine, molecole indispensabili per lo sviluppo ed il corretto funzionamento della maggior parte degli organismi viventi. Dal punto di vista chimico, il DNA è un polimero organico costituito da monomeri chiamati nucleotidi (desossiribonucleotidi o deossiribonucleotidi). Negli eucarioti, il DNA si complessa all'interno del nucleo in strutture chiamate cromosomi ma esiste anche del DNA extra-nucleare assemblato nei mitocondri e nei plastidi. L'informazione genetica del DNA è duplicata prima della divisione cellulare, attraverso un processo noto come replicazione, che evita la perdita di informazione nel passaggio tra diverse generazioni cellulari. L'ordine nella disposizione sequenziale dei nucleotidi costituisce l'informazione genetica, la quale è tradotta con il codice genetico negli amminoacidi corrispondenti. La sequenza amminoacidica prodotta, detta polipeptide, forma le proteine. Il processo di traduzione genetica (comunemente chiamata sintesi proteica) è possibile solo in presenza di una molecola intermedia di mRNA (RNA messaggero), che è generata per complementarità con le quattro basi dei nucleotidi del DNA in un processo noto come trascrizione. Una sequenza di DNA è definita senso se la sua sequenza è la stessa del relativo mRNA. La sequenza posta sul filamento opposto è invece detta antisense. Dal momento che gli enzimi responsabili della traduzione (le RNA polimerasi) lavorano producendo una copia complementare, il filamento necessario per la trascrizione è l'antisense.

Elettroporazione: tecnica che apre dei pori della membrana cellulare per introdurre nelle cellule il DNA o altre sostanze chimiche come chemioterapici. Viene applicata a protoplasti, cellule animali, batteri e lieviti.

Embriode: organismo embrionale, coltivato *in vitro* da poche cellule.

Enzima di restrizione: le deossiribonucleasi II (solitamente note con il nome di enzimi di restrizione) sono una classe di enzimi, appartenente alla classe delle idrolasi, che catalizzano il taglio del DNA per dare frammenti specifici a doppia elica

Epigenetica: lo studio delle modifiche fenotipiche ereditabili nell'espressione del gene, dal livello cellulare (fenotipo cellulare) agli effetti sull'intero organismo (fenotipo, in senso

stretto), causato da meccanismi diversi dai cambiamenti nella sequenza genomica; l'effetto o segnale epigenetico è un cambiamento ereditabile che però non altera la sequenza nucleotidica di un gene, bensì la sua attività e si manifesta quindi anche a livello fenotipico.

Eterosi: incrocio tra individui non imparentati. Il termine eterosi è sinonimo di ibridazione interspecifica. Nella popolazione prodotta di eterosi aumenta la frequenza di eterozigosi, cioè il numero dei *loci* con alleli differenti per il gene di un certo carattere. All'eterosi si associa il fenomeno detto vigore dell'ibrido, in cui il prodotto dell'incrocio possiede un fenotipo particolarmente vigoroso sotto certi aspetti (altezza, produttività o altro).

F1: prima generazione di incroci (ibridi) tra varietà diverse.

Fenotipo: l'insieme delle caratteristiche morfologiche e funzionali di un organismo, quali risultano dall'espressione del suo genotipo e dalle influenze ambientali.

Fotoperiodo: durata dell'illuminazione diurna e intensità delle radiazioni, che varia con la latitudine secondo il ritmo stagionale, e che influenza la fisiologia delle piante e le attività di alcuni animali.

Fuso mitotico: una struttura del citoscheletro degli eucarioti coinvolta nella mitosi e nella meiosi. La sua funzione è di separare i cromosomi e tutto il materiale della cellula madre durante la divisione cellulare per dar origine alle cellule figlie.

Gamete: cellula riproduttiva o germinale matura. Quasi tutti gli eucarioti presentano due tipi di gameti: maschile e femminile. I gameti hanno corredo cromosomico aploide, cioè dimezzato, atto all'unione con un altro gamete. Al momento della fecondazione i due gameti mettono in comune i due corredi e ricostituiscono il corredo diploide, cioè completo del nuovo individuo.

Gene: porzione di genoma localizzata in precise posizioni all'interno della sequenza di DNA contenente le informazioni necessarie per codificare una proteina

Genomica: disciplina biologica che studia l'organizzazione e la struttura dei geni di un organismo nel contesto dell'intero genoma.

Genotipo: la costituzione genetica di un organismo o di un gruppo di individui, corrispondente all'insieme degli alleli presenti per ogni gene. Il genotipo presiede all'espressione dei caratteri somatici (fenotipo).

Impollinazione: il trasporto di polline dalla parte maschile a quella femminile dell'apparato riproduttivo (contenuto nei coni o nei fiori) della stessa pianta o di piante diverse. L'impollinazione rappresenta il principale meccanismo di riproduzione delle piante superiori. Esistono due tipi principali di

impollinazione: l'autoimpollinazione o impollinazione autogama si verifica quando il polline passa direttamente dall'antera di un fiore allo stigma dello stesso fiore (le piante con questo tipo di impollinazione sono dette autogame). L'impollinazione incrociata o eterogama, si verifica quando il polline viene trasportato dall'antera di un fiore allo stigma del fiore di un individuo differente della stessa specie (le piante con questo tipo di impollinazione sono dette allogame).

Linee di sostituzione cromosomica: Una linea di sostituzione cromosomica è una pianta che nel suo genoma contiene una o più porzioni di cromosomi di un'altra pianta (donatrice). Sono linee usate nella ricerca e nel miglioramento genetico, per studiare o migliorare geni localizzati in specifiche posizioni su un dato segmento cromosomico.

Locus: la posizione occupata da un determinato gene in ciascuno dei due cromosomi omologhi.

Marcatore molecolare: una sequenza di DNA conosciuta che può essere identificata mediante un saggio molecolare. Può consistere in una breve sequenza di DNA, come la sequenza che circonda un polimorfismo a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism, SNP), o in una sequenza lunga, come i microsatelliti.

Meiosi: processo di divisione riduzionale mediante il quale una cellula eucariota con corredo cromosomico diploide dà origine a 2 cellule che a loro volta si riprodurranno con corredo cromosomico aploide. Da una cellula madre si formano quattro cellule figlie, tutte diverse fra loro. È il meccanismo cellulare alla base della riproduzione sessuale nelle cellule eucariote.

Microspore: le spore maschili prodotte dagli sporofiti (polline) che nelle piante superiori formano un tubo pollinico atto a fecondare la macrospora (la cellula uovo femminile presente nell'ovario).

Mitocondri: organelli cellulari presenti negli organismi eucarioti (costituiti da una o più cellule che al contrario delle procariote hanno un nucleo ben differenziato contenente la maggior parte del DNA) e considerati la centrale energetica della cellula. Al loro interno avviene la respirazione cellulare, con cui sono in grado di produrre grandi quantità di energia sotto forma di molecole di Adenosina Trifosfato (ATP).

Mitosi: il processo di riproduzione non sessuale delle cellule eucariotiche grazie al quale da una singola cellula se ne formano due geneticamente identiche alla progenitrice.

Mutazione: ogni modifica stabile ed ereditabile nella sequenza nucleotidica di un genoma o più generalmente di materiale genetico (sia DNA che RNA) dovuta ad agenti esterni o al caso, ma non alla ricombinazione genetica.[1] Una mutazione modifica quindi il genotipo di un individuo e può eventualmente modificarne il fenotipo a seconda delle

sue caratteristiche e delle interazioni con l'ambiente. Un tipo frequente di mutazione è la puntiforme, una variazione di sequenza del DNA che interessa uno o pochi nucleotidi (fino a 50).

Nucleotide: in chimica, i nucleotidi sono unità ripetitive degli acidi nucleici (DNA e RNA). Sono costituiti da tre gruppi: una base azotata; uno zucchero a cinque atomi di carbonio; un gruppo fosfato (residuo fosforico).

Oligonucleotide: breve polimero dell'acido nucleico utilizzato nella ricerca e nel miglioramento genetico. Gli oligonucleotidi solitamente si compongono di 13–25 nucleotidi e sono usati per ibridarsi specificamente a sequenze del RNA o del DNA.

Plastidio: organello cellulare caratteristico delle cellule vegetali, avvolto da una doppia membrana, che sintetizza o accumula sostanze; in base ai pigmenti che presenta si distingue in cloroplasto, cromoplasto e leucoplasto.

Ploidia: il numero di set cromosomici presenti in una cellula o organismo. Ogni set si indica con la lettera "n", pertanto una cellula o un organismo con una sola serie di cromosomi avrà ploidia "n" e si definirà aploide (lo sono i gameti o cellule riproduttive prima della fusione tramite riproduzione sessuale). Una cellula/organismo dove ogni cromosoma ha un omologo si definirà diploide (2n), come nel caso della maggior parte delle cellule e degli organismi eucarioti. Cellule ed organismi con numeri più alti di corredi cromosomici (4n, 8n,...) si definiscono poliploidi. I poliploidi possono essere autopoliploidi o allopoliploidi. Si parla di autopoliploidia quando tutti i corredi cromosomici presenti appartengono alla stessa specie; di allopoliploidia quando i corredi cromosomici presenti derivano da piante di specie diverse: ed in questo caso gli assetti cromosomici sono definiti omeologhi (ossia omologhi solo parzialmente).

RNA: (acido ribonucleico) una molecola polimerica implicata in vari ruoli biologici di codifica, decodifica, regolazione e l'espressione dei geni. Come il DNA, l'RNA è assemblato come una catena di nucleotidi, ma a differenza del DNA è più frequente in natura come un singolo filamento ripiegato su sé stesso, piuttosto che un doppio filamento accoppiato. Gli organismi cellulari utilizzano l'RNA messaggero (mRNA) come stampo per trascrivere le informazioni genetiche che dirigono la sintesi di proteine specifiche. Questo processo utilizza le molecole di RNA di trasferimento (tRNA) che fornisce gli aminoacidi all'RNA ribosomiale (rRNA) che li assembla per formare le proteine. Alcune molecole di RNA svolgono altri ruoli attivi all'interno delle cellule per esempio nel catalizzare le reazioni biologiche, nel controllare l'espressione genica o nel percepire e comunicare le risposte a segnali cellulari.

Segregazione: la separazione dei membri di una coppia di alleli in gameti diversi che si verifica durante la meiosi.

Selezione massale: metodo di miglioramento in cui da una popolazione esistente viene selezionato un numero elevato di piante con fenotipo vantaggioso, i cui semi vengono raccolti e mescolati per costituire la nuova popolazione. È usato in colture autogame ed allogame e la selezione si basa su caratteristiche facilmente osservabili come altezza della pianta, colore o dimensione della granella, ecc. La popolazione sviluppata attraverso selezione massale possiede una considerevole variabilità genetica. È il metodo più antico di miglioramento genetico.

Selezione ricorrente: metodo di selezione che prevede la selezione massale combinata con l'incrocio controllato delle piante selezionate per favorire la ricombinazione ad ogni generazione. È un processo ciclico che mira ad aumentare la frequenza di alleli desiderati nella popolazione, allo stesso tempo mantenendo più alta possibile la sua diversità genetica. Si usa soprattutto, ma non solo, nelle piante allogame.

SMART breeding: la sigla inglese SMART sta per "selezione tramite marcatori e tecnologie riproduttive avanzate" ed indica quell'insieme di tecniche alternative all'ingegneria genetica. Metodi tradizionali come l'incrocio controllato di piante parentali e la successiva selezione della progenie sono combinati con la biologia molecolare. Questa combinazione prevede per esempio l'uso di marcatori molecolari per identificare caratteri desiderabili in potenziali piante parentali e l'uso della coltura dei tessuti per rigenerare le piante migliori, riducendo il tempo che intercorrerebbe tra l'incrocio classico, la selezione della progenie e la sua propagazione e al contempo evitando l'uso di piante geneticamente modificate.

Varietà: in senso stretto in botanica, un particolare tipo genetico che nell'ambito di una specie, si è selezionato e propagato spontaneamente costituendo una popolazione. Per esteso si usa anche in agronomia per indicare un genotipo (o un insieme di genotipi simili tra loro che costituiscono una popolazione) di una specie coltivata, ed è usato a volte come sinonimo di cultivar. Il termine varietà "locali" sottolinea la distinzione rispetto alle varietà moderne. Le prime sono il frutto di un processo di adattamento localizzato e quindi sono estremamente diversificate tra loro. Le seconde sono ottenute da un processo di miglioramento genetico formale da parte di soggetti pubblici e privati e sono di solito selezionate per avere una maggior uniformità. È infatti l'ambiente, "aggiustato" ed uniformato grazie all'uso di input esterni, che si adatta alla varietà nei modelli di agricoltura intensiva. La maggior diversità delle varietà locali risiede invece nel fatto che si sono evolute in condizioni di coltivazione con bassi livelli di fertilizzanti e di protezione delle piante, in cui la pressione selettiva favoriva la resistenza e la stabilità, piuttosto che la resa per ettaro. Anche oggi nelle agricolture a basso input e tendenti a un modello agroecologico e locale si continua a far uso di varietà non totalmente uniformi o addirittura di miscugli varietali o popolazioni per potenziare l'effetto tampone della diversità genetica.

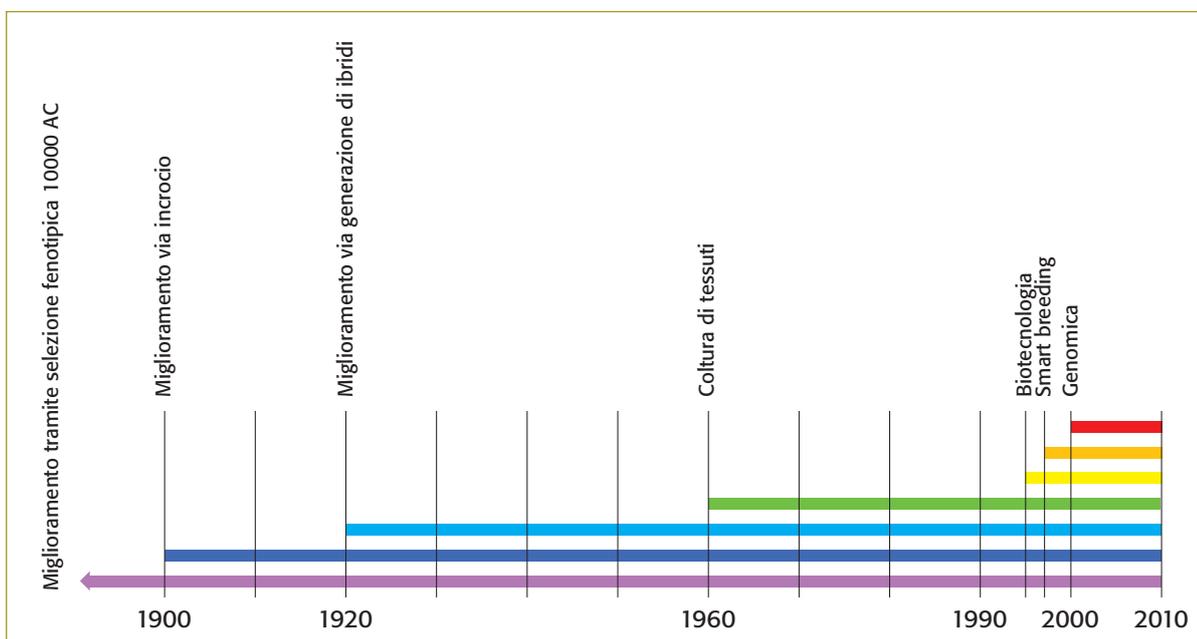
Introduzione

L'agricoltura biologica vede il miglioramento genetico e l'ottenimento di nuove varietà in un'ottica olistica. Pertanto, non solo la varietà in sé ma anche il processo attraverso il quale viene ottenuta devono rispondere ai principi fondanti della pratica del biologico. Vengono quindi considerati criteri fondamentali quelli di preservare l'integrità della pianta, aumentare la diversità genetica, rispettare le barriere di incrocio e le interazioni tra la pianta ed il suolo e tra la pianta ed il clima. Tutte le tecniche di miglioramento genetico che producono variabilità genetica da assoggettare a successiva selezione e propagazione devono quindi essere

attentamente valutate in termini di compatibilità rispetto ai principi dell'agricoltura biologica.

Per millenni, il miglioramento genetico vegetale è stato inscindibilmente legato alla coltivazione e riproduzione delle piante alimentari; come tale era portato avanti dagli stessi agricoltori, in modo (almeno inizialmente) largamente inconscio (Zohary, 2004). Alleli per la non dispersione dei semi, per la mancanza di dormienza, per l'aumentata fertilità sono stati tutti favoriti da questa primordiale selezione massale che avveniva ad ogni ciclo semina-raccolto-semina (Harlan et al., 1973) e trasformava più o meno gradualmente

Pietre miliari nel miglioramento genetico



Modificato da www.die-pflanzenzuechter.de/innovationen.html

una pianta selvatica in una coltivata. Questo passaggio determinò una certa perdita di diversità genetica, noto come il collo di bottiglia della domesticazione. Il successivo adattamento delle prime varietà coltivate a nuovi ambienti grazie alle migrazioni degli agricoltori ha portato ad un graduale reinstaurarsi della variabilità genetica grazie alla diversificazione in numerosissime varietà locali (in inglese landraces, da land = territorio e race = razza) diverse tra loro e caratterizzate al loro interno da una certa disomogeneità genetica (diversità intra-specifica ed intra-varietale) che permette un effetto "tampone" rispetto ad eventi climatici ed ambientali imprevedibili. Con l'avvento del miglioramento genetico "moderno" avvennero dei cambiamenti fondamentali: il miglioramento fu portato dai campi alle stazioni di ricerca, passando nelle mani dei ricercatori e riducendo la varietà di climi, suoli e culture in cui avveniva la selezione. Le stazioni di ricerca con il tempo hanno finito per somigliarsi

sempre più tra di loro e sempre meno ai campi degli agricoltori; la selezione che prima mirava ad un adattamento specifico ad ognuno degli eterogenei luoghi di coltivazione è stata così sostituita dalla selezione per un adattamento più ampio possibile ad ambienti "aggiustati" tramite input chimici esterni e resi pertanto più simili tra loro. Questo processo ha prodotto le varietà ad alta resa e le cultivar ibride a partire dalla Rivoluzione Verde iniziata negli anni Sessanta ed è il modello di selezione che si è maggiormente affermato fino ad oggi (si veda il grafico riassuntivo sulle dinamiche della diversità a pagina 8). Si capisce chiaramente che tale modello produce varietà molto simili tra loro, geneticamente uniformi e adatte ad agricolture convenzionali ma non a sistemi a basso input o tendenti a un modello agroecologico. In questi ultimi funzionano molto meglio varietà non totalmente uniformi o addirittura miscugli varietali o popolazioni, in cui sia potenziato l'effetto tampone della diversità genetica. Tale

diversità invece, con l'affermarsi di un modello specializzato di miglioramento genetico, è andata gradualmente diminuendo, con l'abbandono delle varietà locali a favore di varietà ad alta resa con il loro pacchetto di input esterni. Intorno agli anni '80, infine, lo sviluppo di nuove tecnologie capaci di indagare e manipolare la componente genetica degli organismi viventi ha fatto sì che le industrie sementiere abbiano prodotto sempre più varietà con l'aiuto di queste tecnologie.

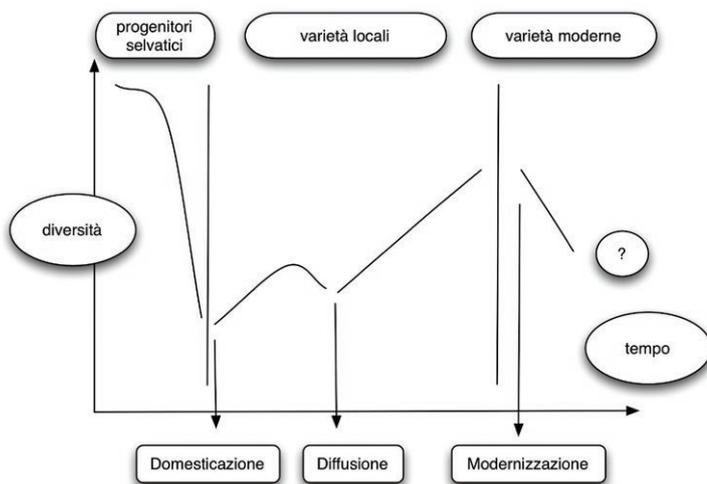
La discussione sulla compatibilità delle moderne tecniche di miglioramento genetico con l'agricoltura biologica ha animato il settore del bio per molti anni, ed è stata portata in conferenze e seminari nazionali ed internazionali (Wyss et al., 2001; Lammerts et al., 2007; Oehen and Thommen, 2009). Finora tuttavia, a causa dell'estrema complessità delle tematiche e della forte componente emotiva che caratterizza il dibattito, in particolare sugli OGM, non esisteva una valutazione obiettiva e trasparente delle moderne tecniche del breeding. Inoltre, nuove tecniche (i.e. le "new plant breeding techniques" ossia le nuove biotecnologie di miglioramento genetico vegetale) emergono costantemente dal mondo della ricerca e sviluppo, e vengono velocemente incorporate nella pratica del miglioramento genetico convenzionale, sollevando questioni sempre nuove.

La complessità di queste tecnologie può causare un consi-

derevole scetticismo da parte dei consumatori e degli attori del biologico. D'altronde, se certe tecnologie venissero rifiutate a priori, il biologico rischierebbe di non beneficiare delle potenziali opportunità offerte dal breeding moderno divenendo meno competitivo nella continua sfida di ottenere varietà più produttive e più sostenibili. A questo scopo, è essenziale poter disporre di una visione d'insieme su tutte le tecniche ad oggi usate per il miglioramento genetico vegetale, così come su quelle in via di sviluppo, e definire dei criteri che permettano una valutazione pragmatica di ognuna di queste secondo i principi del biologico.

Ad oggi, due pilastri fondanti del recentemente rinnovato regolamento Europeo per il biologico (Reg. 2018/848) sono la proibizione di usare varietà geneticamente modificate e l'obbligo di impiegare esclusivamente sementi o materiale di riproduzione prodotti in regime bio.

Evoluzione della diversità genetica nel tempo, attraverso le fasi di domesticazione dai progenitori selvatici, diversificazione e diffusione delle varietà locali, e selezione delle varietà moderne



Perchè c'è bisogno di un miglioramento genetico (specifico) per il bio?

Requisiti per l'agricoltura biologica

Una efficace risposta a questa domanda è contenuta nel regolamento Europeo sull'Agricoltura Biologica. Il punto 32 del preambolo riconosce che "mentre l'agricoltura non biologica dispone di più strumenti esterni per adattarsi all'ambiente in modo da conseguire una crescita ottimale delle colture, i sistemi di produzione biologica necessitano di materiale riproduttivo vegetale che sia in grado di adattarsi alla resistenza alle malattie, alle diverse condizioni pedoclimatiche locali e alle specifiche pratiche colturali dell'agricoltura biologica che contribuiscono allo sviluppo del settore biologico. Di conseguenza, è importante sviluppare materiale riproduttivo vegetale biologico adatto all'agricoltura biologica."

In altre parole, per una produzione alimentare efficiente e sostenibile in regimi bio, tanto le varietà come i metodi devono essere perfettamente adattati al luogo di coltivazione. Considerato che le varietà al momento disponibili sul mercato provengono da programmi di miglioramento condotti in ambienti e con metodi convenzionali (Lammerts van Bueren et al., 2011), il potenziale genetico per l'agricoltura biologica rimane largamente inesplorato e sottoutilizzato. Caratteri di rilevanza per l'agricoltura bio, come la resistenza a malattie trasmesse tramite seme, la competizione con le infestanti e l'efficienza nell'assorbimento dei nutrienti minerali, non vengono prese in considerazione nel processo di selezione; le sementi in commercio vengono spesso vendute conciate, mentre per le piante adulte sono previsti trattamenti con erbicidi e antiparassitari ed integrazioni massicce di fertilizzanti chimici. Al contrario, sarebbe importante costruire dei programmi di miglioramento che strutturino fin dall'inizio i loro obiettivi in base alle reali condizioni di coltivazione in agricoltura biologica, in modo da aumentare l'efficienza e la stabilità delle rese di questo settore.

L'agricoltura biologica promuove il mantenimento di un'alta diversità genetica nelle aziende. Coltivare un maggior numero di specie permette di far fronte alla più spiccata eterogeneità delle fattorie biologiche, in termini di suolo e clima, di densità di semina, di schemi di rotazione e di strategie di commercializzazione. Sarebbe quindi ideale che l'agricoltore bio potesse scegliere tra numerose cultivar, ognuna adattata ad un ambiente specifico a scala regionale. Tali varietà dovrebbero permettere rese sufficientemente alte e soprattutto stabili, riducendo al minimo la necessità di intervenire con input esterni e massimizzando la qualità tecnologica e nutrizionale. L'agricoltura biologica differisce da quella convenzionale sotto molti aspetti, in particolare quelli che riguardano il tipo e la quantità di agenti fertilizzanti impiegati e l'approccio al controllo di infestanti e parassiti. Difatti, le aziende biologiche cercano di chiudere il ciclo dei nutrienti applicati alle coltivazioni, usando fertilizzanti animali o vegetali generati in azienda invece di acquistare all'esterno prodotti sintetici come quelli usati nella produzione convenzionale. Le risorse naturali aziendali possono essere ottimizzate coltivando legumi e altre colture di copertura con il preciso scopo di fissare l'azoto nel terreno, oppure

scegliendo varietà che si distinguono per una spiccata efficienza nell'assorbimento minerale. Il controllo delle erbe infestanti si ottiene grazie non all'applicazione di erbicidi ma tramite un uso ottimale delle rotazioni, di metodi meccanici e varietà competitive a rapida crescita. La gestione di malattie e parassiti è resa possibile non con l'applicazione di pesticidi ma piuttosto incoraggiando la presenza di organismi antagonisti, parassitoidi e simbiotici (i.e. massimizzando la biodiversità funzionale) insieme alla coltivazione di varietà resistenti o tolleranti. Varietà sviluppate per l'agricoltura bio dovrebbero possedere caratteri specifici, tra cui:

- Resistenza a malattie trasmesse via suolo e tramite il seme (questo aspetto non è più considerato importante nel breeding convenzionale in quanto la disponibilità di trattamenti chimici di sintesi è molto più vantaggiosa).
- Sviluppo giovanile rapido.
- Competizione con e tolleranza alle infestanti.
- Buona resistenza all'allettamento (soprattutto in piante alte).
- Aumentata efficienza nell'assorbimento dei nutrienti minerali grazie a un sistema radicale ben sviluppato e capace di entrare in simbiosi favorevoli con i microrganismi del suolo.
- Caratteri legati alla qualità nutritiva.

Gli obiettivi di un programma di miglioramento per il bio dovrebbero inoltre rispondere alle specifiche esigenze degli agricoltori, i selezionatori, gli altri attori della filiera ed i consumatori.

Concentrazione del mercato sementiero

Il miglioramento genetico vegetale è dominato da compagnie private che rifinanziano le loro attività grazie al rilascio di licenze per la vendita del materiale. Attività di selezione varietale al di fuori del settore commerciale sono di solito circoscritte allo sviluppo di materiale iniziale, che viene poi ulteriormente selezionato per la creazione di una varietà da miglioratori privati.

Inoltre, il breeding tende a concentrarsi su un numero relativamente ridotto di specie (mais, colza, riso, soia) che hanno maggiore importanza economica e permettono un rapido recupero degli investimenti. In questo modo, il cosiddetto "yield gap" ovvero la differenza nelle rese rispetto ad altre specie aumenta rapidamente, lasciando indietro il miglioramento delle colture considerate minori come i legumi azoto-fissatori, insostituibili in agricoltura biologica. Le conseguenze sono rotazioni sempre più semplificate e una minor capacità tra gli agricoltori di gestire coltivazioni "minori".

Il settore commerciale delle sementi ha conosciuto uno straordinario processo di concentrazione negli ultimi 40 anni. Lo scostamento dal modello della piccola azienda sementiera familiare verso la compagnia multinazionale è coinciso con la selezione di ibridi commerciali. Grosse compagnie agrochimiche, impegnate soprattutto nella ricerca biotecnologica, iniziarono ad acquisire compagnie di selezione e produzione di sementi negli anni '80. Negli anni '90,

iniziarono a raggrupparsi in multinazionali a scala globale con ulteriori acquisizioni e fusioni tra concorrenti.

La fusione di compagnie agro-chimiche, farmaceutiche e sementiere fu facilitata dalla possibilità di mettere in comune l'uso di piattaforme tecnologiche avanzate. I primi metodi di ingegneria genetica erano appena stati sviluppati, ma il capitale iniziale per investire in essi rimaneva altissimo, rendendo molto più economica la condivisione degli investimenti per applicare queste tecnologie nascenti tanto al settore dello sviluppo di farmaci e agrofarmaci come a quello dello sviluppo di nuove varietà per il mercato sementiero globale.

In questo modello, qualsiasi nuovo carattere inserito in una nuova varietà veniva brevettato, impedendo l'uso del materiale da parte di altri selezionatori e la risemina da parte degli agricoltori; in parallelo e per agganciare ulteriormente i consumatori, si affermava la strategia di accoppiare la vendita di questi nuovi semi a quella di prodotti di sintesi per la protezione della coltivazione (Harl, 2000).

Oggi, le vendite di sementi sono dominate globalmente da un esiguo numero di compagnie. Le tre più grandi, Monsanto (oggi Bayer), DuPont e Syngenta, controllano il 53 % del mercato globale delle sementi protette da proprietà intellettuale (dal sito di ETC Group).

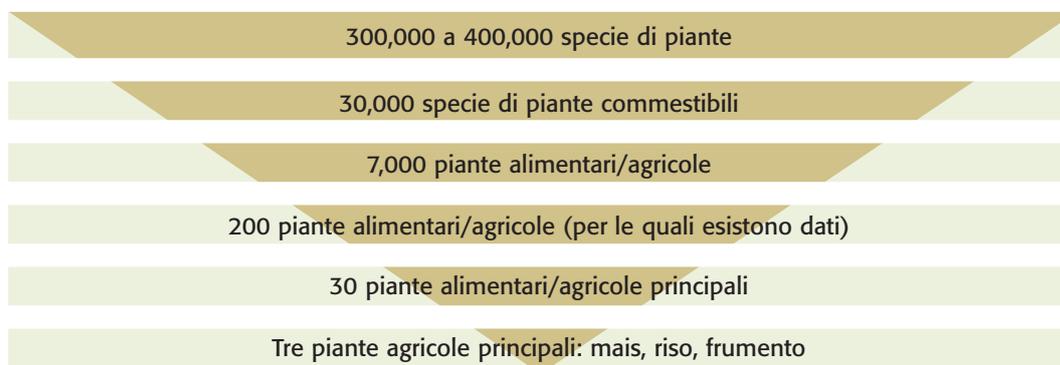
C'è stata infatti una forte centralizzazione dei diritti di proprietà intellettuale per le specie coltivate più importanti (frumento, mais, soia, patata, segale e colza), particolarmente nei paesi sviluppati. A livello globale, le 10 maggiori compagnie possiedono certificati di protezione vegetale per il 40% delle varietà di frumento, e fino al 70% di quelle di colza e mais. Le principali compagnie sementiere mondiali lavorano ormai di routine con tecniche di ingegneria genetica i cui alti costi sono ripagati dai proventi dei brevetti.

Nel miglioramento genetico convenzionale le nuove varietà vengono selezionate quasi esclusivamente nelle stazioni di ricerca, spesso con l'ausilio di moderne tecniche di laboratorio e solo il prodotto finale viene valuta-

to nelle aziende sperimentali prima di essere registrato e commercializzato da una ditta sementiera. Questo sistema è finalizzato all'ottenimento di un numero limitato di cultivar ad "ampio adattamento geografico", protette da diritti di proprietà intellettuale. In direzione opposta al modello appena descritto, in agricoltura biologica risultano vincenti strategie quali massimizzare la diversità genetica, lavorare per ottenere cultivar ad adattabilità locale, decentralizzare la selezione e favorire la partecipazione di agricoltori ed altri attori della filiera. La riprova è il successo riscosso negli ultimi anni in Europa da progetti (come Solibam e Diversifood 1) di rivalutazione, di materiali eterogenei come le varietà locali, i miscugli e le popolazioni evolutive (per queste ultime si veda la sez. pag. 44), e nei quali il lavoro di animazione e ricerca viene condiviso tra agricoltori e ricercatori seguendo i principi del miglioramento genetico partecipativo (PPB, participatory plant breeding in inglese). Un programma di questo tipo sposta di nuovo l'accento sull'adattamento specifico e le interazioni genotipo-ambiente, contribuendo così a ottimizzare le rese a livello di azienda. Infatti il PPB sfrutta i vantaggi della selezione nell'ambiente di destinazione grazie alla partecipazione degli agricoltori in tutte le decisioni chiave (Ceccarelli et al., 2009; Ceccarelli, 2011). Nel PPB è possibile utilizzare popolazioni evolutive come materiale da sottoporre a selezione da parte degli agricoltori (miglioramento partecipativo-evolutivo), generando da una stessa popolazione di partenza varietà e popolazioni diverse da zona a zona, a seconda delle necessità specifiche di ogni agricoltore e delle caratteristiche dei suoi campi. Le varietà e le popolazioni ottenute in questo modo mantengono un elevato grado di diversità genetica, in contrasto con le varietà standard, iscritte al registro nazionale varietale, in cui tutte le piante sono geneticamente identiche. I risvolti legali determinati dai richiami all'uniformità delle normative i sementiere, saranno discussi nella prossima sezione.

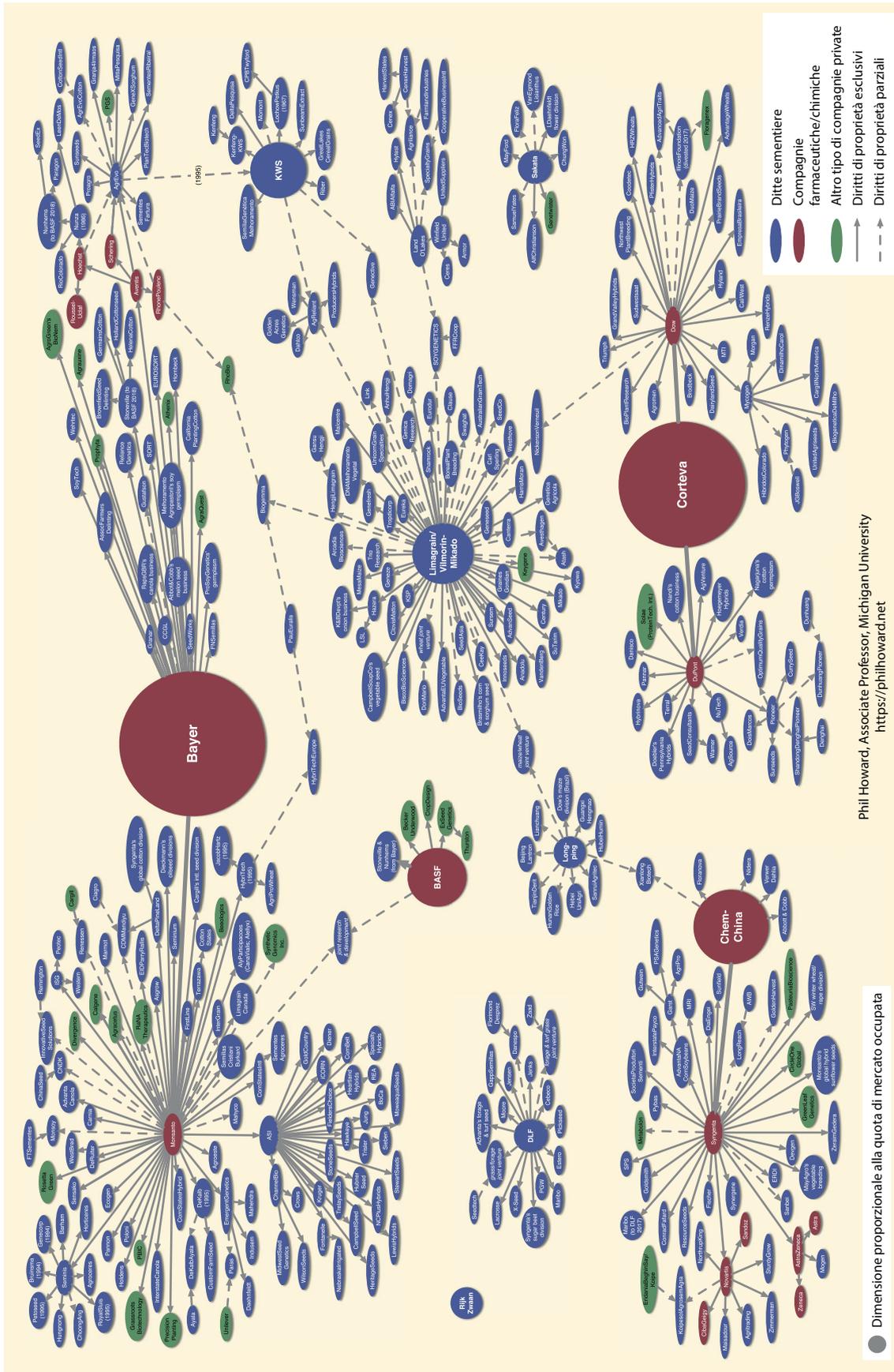
1 www.solibam.eu; www.diversifood.eu

Perdita di diversità nel miglioramento genetico



Modificato da Haußmann and Parzies (2009)

Cambiamenti nella struttura del mercato sementiero 1996–2018



Phil Howard, Associate Professor, Michigan University
<https://philhoward.net>

Da: Phil Howard (<https://philhoward.net/2018/12/31/global-seed-industry-changes-since-2013/>)

Inquadramento legale

La protezione delle varietà vegetali

L'attuale contesto legale nel quale si inquadra il miglioramento genetico delle piante e la moltiplicazione e distribuzione delle sementi si compone di un gran numero di linee guida nazionali e internazionali, convenzioni, direttive e regolamenti.

Le teorie dello sviluppo agricolo dal 1960 a oggi, più o meno in tutto il mondo, hanno promosso un modello lineare nel quale gli agricoltori sono semplici acquirenti di semi e l'attività agricola è totalmente separata da quelle del miglioramento genetico e, la produzione e circolazione di sementi. La burocrazia ha ufficialmente sancito questo approccio, negando agli agricoltori il diritto di vendere sementi ed autorizzando soltanto le ditte sementiere. Inoltre, solo il seme di varietà iscritte nel registro ufficiale nazionale² può essere commercializzato. Per poter essere iscritte tali varietà devono essere distinte, uniformi e stabili (criteri DUS dall'acronimo inglese) e, se si tratta di specie agrarie, passare il test della VCU (value for cultivation and use, ossia una stima agronomica del valore aggiunto della nuova varietà rispetto alle varietà già presenti sul mercato). I caratteri presi in considerazione per determinare il VCU per ogni specie vengono decisi dagli uffici nazionali o Europei competenti in materia di varietà vegetali ma generalmente comprendono caratteri agronomici quali la resa, la resistenza alle malattie, la durata del ciclo fenologico e a volte caratteri di post-raccolta. Tutte queste valutazioni tendono ad avvenire tramite prove di campo condotte in condizioni di agricoltura convenzionale, risultando generalmente inadeguate a cogliere il valore aggiunto di materiali ottenuti attraverso processi di selezione e adattamento in/per un contesto biologico. Inoltre, la necessità di rispettare il criterio di uniformità e stabilità di fatto esclude dalla possibilità di registrazione molte delle varietà locali ed i materiali eterogenei che tanta importanza rivestono in sistemi agricoli locali e sostenibili.

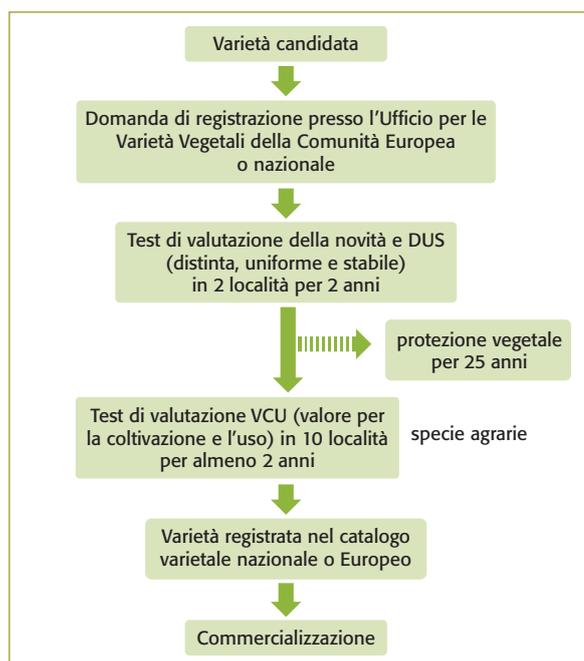
Nel miglioramento genetico e nella produzione sementiera dominanti, si è poi andato affermando sempre più l'uso di modelli di proprietà intellettuale restrittivi (diritti del costituente, copyright, indicazioni geografiche e brevetti) a tutela dell'innovazione individuale su cui si basano le varietà commerciali, concedendo al titolare del diritto (un selezionatore o la sua ditta di appartenenza) un monopolio esclusivo per un certo periodo di tempo.

Un passaggio cruciale sulla via verso la protezione legale della selezione vegetale è stato la firma della Convenzione sulla Protezione delle Nuove Varietà di Piante (UPOV) il 2 Dicembre 1961, la quale stabilisce regole valide a livello internazionale per la protezione delle varietà. La Convenzione UPOV costituisce una forma *sui generis* di proprietà intellettuale, sviluppata nel contesto del miglioramento genetico vegetale per riconoscere il diritto del selezionatore sul materiale ottenuto, la cosiddetta privata. Sotto UPOV, il selezionatore può rivendicare i diritti su ogni atto di moltiplicazione

del "suo" materiale, come una forma di compensazione per il suo lavoro di breeding. Nelle prime versioni della convenzione UPOV (1961 e 1978), il consenso del selezionatore non era richiesto qualora altri selezionatori volessero utilizzare il "suo" materiale per inserirlo in un ulteriore lavoro di selezione (eccezione del selezionatore), o qualora un agricoltore volesse riprodursi di anno in anno in azienda la varietà protetta (privilegio dell'agricoltore). In questo secondo caso, poteva essere richiesto il pagamento di una quota monetaria, a seconda del paese o della zona di coltivazione. Queste eccezioni erano parte integrante della Convenzione UPOV sul e la rendevano molto diversa dalla protezione tramite brevetti. Nella versione del 1991 queste eccezioni sono state ridotte (è lasciata ai singoli paesi la decisione se permettere o meno agli agricoltori di riprodurre il seme di varietà protette) avvicinando il sistema UPOV al brevetto industriale per favorire i diritti dei costitutori.

Come per il registro nel catalogo varietale, anche per ricevere la protezione secondo UPOV, una varietà deve essere distinta, sufficientemente uniforme e stabile (i criteri DUS di cui sopra) e deve avere un nome proprio per essere riconoscibile da altre. Il sistema è efficiente quanto a garantire una compensazione economica al lavoro dei selezionatori e di assicurare che vengano sviluppate sempre nuove varietà. D'altronde, risponde solo in parte alle esigenze dell'agricoltura biologica, perché ancor più che la registrazione varietale nei cataloghi nazionali, è costruito sull'idea di rilasciare varietà uniformi geneticamente, ampiamente adattabili e pertanto con vasto potenziale di distribuzione geografica e di mercato.

Procedure per l'iscrizione di una varietà al registro nazionale per la commercializzazione ed eventuale protezione sotto UPOV



² <https://www.sian.it/mivmPubb/autenticazione.do>

Aperture nella legislazione Europea. Le varietà da conservazione e i materiali eterogenei

Per coniugare la conservazione della biodiversità agricola, la partecipazione degli agricoltori alla ricerca ed alla circolazione delle sementi, con i requisiti delle legislazioni sementiere e dei regimi di privativa, nel 1998 la UE ha introdotto il concetto di varietà da conservazione. La Direttiva che definisce tali varietà riconosce "che è essenziale garantire che vengano conservate le risorse genetiche vegetali, [...] un fondamento giuridico a tal fine dovrebbe essere introdotto per consentire, nel quadro della normativa concernente la commercializzazione delle sementi, la conservazione, mediante l'utilizzazione *in situ*, delle varietà minacciate da erosione genetica". La possibilità di commercializzazione delle sementi di varietà da conservazione, con criteri e procedimenti *ad hoc*, crea quindi uno spazio di legalità per i materiali fino ad allora "illegali" a livello commerciale e che circolavano solo informalmente. L'intenzione è quella di favorire un mercato specifico, con regole più appropriate alle necessità degli agricoltori biologici e alimentato da piccole ditte sementiere decentralizzate sul territorio, che possa coesistere in parallelo al settore formale di grande scala.

Inoltre dal 2014, la UE ha aperto la possibilità di commercializzare in via sperimentale materiale eterogeneo (decisione 2014/150/EU), come le popolazioni evolutive (vedi pag. 44), ovvero materiale con un basso livello di uniformità che non permette la loro iscrizione nel catalogo. Dal 2021 entrerà poi in vigore il nuovo regolamento europeo per il biologico, che prevede l'utilizzo di "varietà per il biologico" e "materiale eterogeneo biologico". Per maggiori approfondimenti su questi temi e sulla legislazione sementiera si veda l'opuscolo "I sistemi sementieri" di RSR disponibile qui: <https://bit.ly/2VtAF2C>

I brevetti

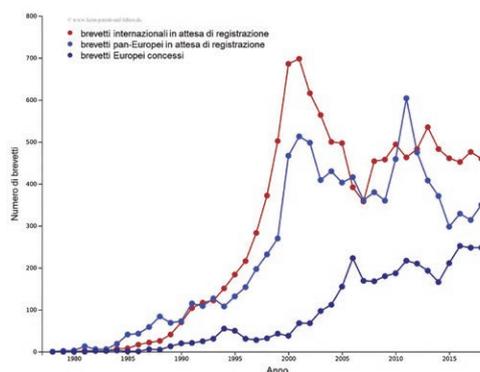
Negli Stati Uniti, oltre alla Protezione per le Varietà Vegetali di UPOV, sono ammessi brevetti chiamati "utility patents" e "plant patents". Nell'Unione Europea, al contrario, l'applicazione di brevetti a piante e sementi è ancora un tema altamente controverso. L'inquadramento legale per la protezione tramite brevetti di materiale vegetale in Europa è fornito dalla Convenzione Europea per i Brevetti e la Direttiva EU 98/44 sulla protezione delle invenzioni biotecnologiche. Secondo l'articolo 4, paragrafo 1 (a) di detta Direttiva, varietà di piante *per se* (così come razze animali) non sono brevettabili. Una varietà definita nella sua unicità dal suo genoma e dall'espressione di certe caratteristiche che risultano da uno specifico genotipo o combinazione di genotipi. Allo stesso tempo, la legge brevettuale Europea prevede che siano brevettabili "invenzioni" in campo vegetale che comprendano più di una varietà di piante. Questo è il caso, per esempio, di un brevetto su un certo carattere identificato da un selezionatore che ricorre in diverse varietà di una specie. Al contrario, i metodi innovativi di selezione applicabili a più di una varietà o razza sono brevettabili, con il risultato indiretto di rendere brevettabili anche i prodotti ottenuti con tali metodi.

Sempre al paragrafo 1 della Direttiva di cui sopra, il punto (b) esclude però dalla brevettabilità quei "procedimenti essenzialmente biologici di produzione di vegetali o di animali". Lo stesso divieto appare nell'articolo 53 della Convenzione Europea sui Brevetti (EPC) che afferma che "brevetti Europei non verranno rilasciati [...] per piante ed animali, o procedimenti essenzialmente biologici per la loro produzione. Questo non vale per procedimenti microbiologici né per i prodotti di tali processi". Nonostante questo, negli ultimi anni l'Ufficio Brevetti Europeo (EPO), ha concesso una serie di brevetti quantomeno controversi, proprio perché si tratta di varietà ottenute con procedimenti che possono essere considerati essenzialmente biologici o perché carenti dell'elemento di novità. Esempi sono i brevetti concessi in broccolo (brevetto EP1597965 per una varietà la cui forma facilita la raccolta meccanizzata), in pomodoro (EP1026942 per una varietà senza semi) ed in melone (brevetto EP 1962578 per una varietà resistente a certi virus). Nel caso del broccolo e pomodoro i procedimenti usati erano la sola selezione ed incrocio (anche se appoggiata da tecniche molecolari di "smart breeding") mentre nel caso del melone il carattere di resistenza non era niente di nuovo perché presente e conosciuto in una varietà indiana usata sempre con tecniche convenzionali come fonte della resistenza nella varietà per la quale veniva chiesto il brevetto.

La tendenza attuale dell'EPO di fatto rende brevettabili le piante, anche quando i loro caratteri distintivi risultano semplicemente i prodotti di un processo - spesso nemmeno troppo innovativo (i.e. non-biotecnologici ed essenzialmente biologici) - di caratterizzazione genetica e selezione. In questo modo, diverse centinaia di brevetti in materia vegetale sono già stati concessi, contrariamente a quanto stabiliscono le direttive Europee in materia.

L'estensione delle leggi sui brevetti al miglioramento genetico vegetale ha portato a profonde restrizioni all'uso della diversità genetica, non prevedendo né il privilegio del selezionatore né quello dell'agricoltore sulla moltiplicazione in azienda delle sementi. Come se non bastasse, i brevetti spesso coprono tutte le fasi della catena di valore - dal campo alla tavola - e pertanto riducono fortemente l'indipendenza dei produttori di cibo. Il mondo dell'agricoltura biologica, insieme a molti consumatori, rifiuta i brevetti sugli organismi viventi.

Numero di brevetti su piante richiesti e concessi in Europa dal 1978 (modificato da: <http://www.kein-patent-auf-leben.de/patentdatenbank/>)



Organismi geneticamente modificati e nuove tecniche di selezione delle piante (NPBT)

Secondo la Federazione Internazionale dei Movimenti di Agricoltura Biologica (IFOAM) ed il Regolamento EC-ECO No. 834/2007 del 28 Giugno 2007 sulla produzione biologica di prodotti agricoli, soltanto quelle varietà che non sono geneticamente modificate sono ammesse in agricoltura biologica. La Direttiva EU 2001/18/EC sull'emissione deliberata nell'ambiente di OGM stabilisce che la presenza di piante geneticamente modificate debba essere segnalata da una specifica etichettatura.

Ad oggi, tuttavia, le definizioni legali di certi stati Europei differiscono dalle definizioni da quelle dell'Unione o da quelle di alcune organizzazioni del mondo del biologico, come IFOAM (Federazione Internazionale dei Movimenti per l'Agricoltura Biologica). Le piante che derivano da fusioni cellulari per esempio sono classificate come OGM dalla legge Europea solo nel caso in cui le piante coinvolte non possano essere incrociate tramite metodi tradizionali di miglioramento genetico. Secondo IFOAM, invece, le fusioni cellulari sono considerate *in toto* operazioni di ingegneria genetica e qualsiasi varietà derivi da esse non può essere usata in agricoltura biologica. I prodotti di fusioni cellulari, come molti ibridi di cavolfiore, broccolo ed altri ortaggi, non sono soggette ad etichettatura obbligatoria. Questo scenario causa considerevoli incertezze nel mondo dell'agricoltura biologica.

Inoltre, alle tecniche di manipolazione genetica già in uso da qualche decennio come la mutagenesi, la transgenesi e la fusione cellulare, si stanno affiancando nuovi strumenti basati sull'uso di DNA ricombinante e sulle conoscenze di

genomica e raggruppati sotto la sigla di NPBT (new plant breeding techniques ovvero nuove tecniche di selezione delle piante). Caratteristica comune alle NPBT è quella di produrre modificazioni genetiche molto simili se non indistinguibili da quelle ottenibili attraverso metodiche più tradizionali quali l'incrocio e la mutagenesi casuale. Ciò rende sempre più nebulosa la definizione di cosa sia o non sia un organismo geneticamente modificato e difficile decidere che normativa applichi ai prodotti di queste tecniche. Tra le NPBT più discusse sono la cis-genesi e il "genome editing", descritte a partire da pag. 26. Con queste tecniche si interviene in un punto specifico del genoma di un organismo (animale o vegetale), sostituendo una porzione di DNA con quella di un'altro organismo appartenente allo stesso genere ma specie diversa (cis-genesi), o modificando direttamente in modo mirato determinate sequenze di basi nel DNA in modo da silenziare o modificare l'espressione di un gene (genome editing).

Il Consorzio Europeo per il Miglioramento Genetico Biologico (ECO-PB) nonché diverse ONG hanno lavorato intensamente per richiedere che i prodotti di queste tecniche (detti "nuovi OGM") siano considerati equivalenti ai "vecchi" OGM e che le metodologie vengano assoggettate alla stessa legislazione. In effetti, nel Luglio 2018, la Corte di Giustizia dell'Unione Europea ha deliberato che la direttiva sugli OGM si applica anche agli organismi ottenuti con tecniche di mutagenesi utilizzate in periodi posteriori alla sua stessa adozione, come il genome editing.

Strategie per ottimizzare la selezione varietale

Il Regolamento EC No 834/2007 stabilisce che i produttori biologici possono usare solamente semente e materiale di propagazione prodotto in condizioni di agricoltura biologica. Le piante madri da cui proviene la semente o il materiale vegetativo (più avanti useremo il termine "sementi" con accezione generale) devono essere state coltivate per almeno una generazione in condizioni biologiche. Per le perenni, si stipula invece un periodo di almeno due stagioni vegetative. Le sementi prodotte in questo modo si definiscono "sementi biologiche"; a titolo eccezionale, sementi non trattate NON riprodotte in bio possono essere approvate come sementi per il biologico se non esistono sementi riprodotte in regime biologico per quella specifica specie/varietà. Tuttavia, questo non dice nulla su come la varietà da cui le sementi provengono è stata selezionata e testata in campo o se è effettivamente adatta alla coltivazione biologica. In conclusione, qualsiasi varietà le cui sementi o il cui materiale vegetativo sono stati riprodotti in condizioni di agricoltura bio è ammessa nel biologico, sempre che non siano state

geneticamente modificate o che vi sia su di esse un divieto da parte di una organizzazione locale o nazionale, come discusso sopra.

Le varietà esistenti sul mercato possono essere classificate nei seguenti gruppi (Wolfe et al., 2008):

I Varietà da programmi di miglioramento in condizioni convenzionali (non-bio)

Nei programmi di miglioramento convenzionali, la selezione e la propagazione avvengono con l'uso di trattamenti di sintesi sulla semente, erbicidi e fertilizzanti chimici.

Lo sviluppo varietale è disegnato sulle necessità del settore e del mercato agricolo convenzionale. Dando per scontato il presupposto che una varietà si comporterà altrettanto bene in condizioni di agricoltura bio e non bio, le migliori varietà provenienti da programmi convenzionali sono spesso coltivate anche in agricoltura biologica.

Esempi di centri con programmi di miglioramento convenzionali in Italia	
Cereali	CREA-CER Centro di ricerca per la cerealicoltura; CREA-RIS Unità di ricerca per la Riscoltura; CREA-MAC Unità di ricerca per la maiscoltura; Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia
Frutta	CREA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura;
Orticole	CREA-ORA Unità di Ricerca per l'Orticultura

Esempi di centri con programmi di miglioramento in biologico in Italia ed Europa	
Cereali	Rete Semi Rurali; Cereal breeding Peter Kunz e.V. (CH); Cereal breeding research, Darzau (D); Keyserlick Institute (D); Dottenfelderhof Association (D); The Organic Research Centre, Elm Farm (GB)
Orticole	Sativa Rheinau AG (CH); Kultursaat e.V. (D); Verein Saat: Gut (D) ; Rete Semi Rurali
Frutta	PomaCulta (CH)

Il Varietà da programmi di miglioramento per il biologico e regimi basso input

Questi programmi affiancano a obiettivi di selezione "convenzionali", obiettivi specifici per sistemi agricoli biologici o a basso input. Metodi di ingegneria genetica (inclusa la fusione cellulare) non sono utilizzati e normalmente, la selezione di una varietà in questi sistemi prevede che l'incrocio e le prime fasi di selezione avvengano in condizioni convenzionali, mentre generazioni successive vengono testate anche in condizioni di coltivazione biologica. Il mantenimento e la produzione di materiale base possono anche avvenire in convenzionale, mentre la propagazione della semente certificata (cioè pronta per il mercato) deve sempre essere condotta in condizioni biologiche.

Esempi di centri con programmi di miglioramento per il biologico e regimi basso input in Italia:	
Cereali	Università degli Studi di Firenze (frumento tenero, duro e farro); Università degli Studi di Bologna (frumento tenero); Università degli Studi di Perugia (orzo); CREA-CER (frumento duro); Università degli Studi di Catania (frumento duro)
Orticole	CREA-ORA Unità di Ricerca per l'Orticultura (pomodoro, zucchini); Rete Semi Rurali (pomodoro); Università degli Studi di Catania (Brassicaceae); Arcoiris Sementi
Frutta	CREA-FRU Centro di Ricerca per la Frutticoltura; Centro di Sperimentazione Laimburg

III Varietà da programmi di miglioramento in condizioni di agricoltura biologica

Questo tipo di programmi sono rivolti esclusivamente alle necessità dell'agricoltura biologica.

Tutte le fasi del programma, dall'incrocio e selezione fino alla propagazione e conservazione delle varietà, sono svolte in condizioni di agricoltura biologica. Le tecniche di miglioramento usate sono totalmente coerenti coi principi dell'agricoltura bio; a livello normativo, le varietà selezionate in questo modo si possono definire "varietà biologiche" e possono essere pubblicizzate e vendute come tali.

In molte organizzazioni, lo sviluppo di programmi di selezione interamente dedicati al bio (la categoria III appena descritta) è venuta successivamente a programmi in cui la sola propagazione delle sementi veniva condotta con criteri ecologici (dopo incroci e selezione in agricoltura convenzionale – la categoria II descritta sopra); un'eccezione è costituita dal movimento biodinamico, che fin da molto presto si è posto delle domande su come condurre in modo più coerente anche il miglioramento genetico. Diversi decenni fa infatti, i biodinamici (riuniti nell'Associazione di Selezionatori Biodinamici) iniziarono i propri programmi di selezione, che stanno adesso dando i loro frutti. Le ragioni per cui tali iniziative nascono raramente risiedono nella relativamente piccola estensione media delle aziende biologiche e negli alti costi associati con lo sviluppo e l'approvazione di nuove varietà.

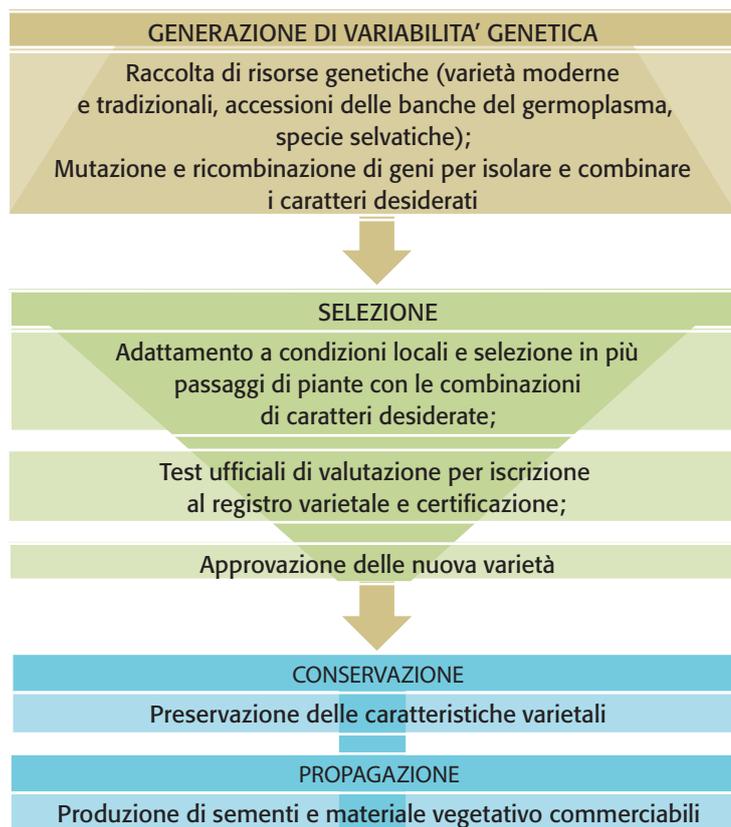
Diversi modelli strategici di finanziamento per impostare un più efficace sistema di selezione per il bio vengono da tempo discussi all'interno del Consorzio Europeo per il Miglioramento Genetico Biologico. Gli approcci che al momento godono di maggior successo prevedono una combinazione di fondi pubblici, donatori privati (fondazioni), fondi da progetti di ricerca ed accordi tra produttori biologici e compagnie sementiere.

Per massimizzare la diversità di specie e varietà disponibili per l'agricoltura biologica, sarebbe auspicabile mettere in piedi progetti di breeding con garanzia di finanziamento a lungo termine, in collaborazione e sinergia con organizzazioni impegnate da tempo nel miglioramento, anche convenzionale. In questa direzione, sarà importante che la comunità del bio si presenti il più compatta possibile, comunicando le sue necessità e preoccupazioni al resto del settore e mantenendo un dialogo aperto tra miglioratori, ricercatori, agricoltori, commercianti e consumatori.

Tecniche per la selezione e la propagazione delle piante

Il miglioramento genetico comprende tutte le attività che mirano a migliorare le caratteristiche genetiche di una specie coltivata. La chiave del processo sta nel trovare caratteristiche interessanti ed ereditabili e nel combinarle con altre caratteristiche altrettanto positive, cercando il miglior equilibrio tra tutti i possibili caratteri oggetto di selezione.

Fasi del miglioramento genetico vegetale e loro influenza sulla diversità genetica



Una nuova varietà può essere ottenuta semplicemente attraverso una selezione ripetuta negli anni degli individui migliori all'interno di una popolazione (selezione massale), oppure tramite incrocio. In questo caso, le piante parentali portatrici dei caratteri desiderati (piante coltivate o progenitori selvatici della specie oggetto di selezione) possono provenire da banche del germoplasma (dove sono conservate *ex situ*) o direttamente dai campi (conservazione *in situ/on farm*). Queste piante vengono poi incrociate per trasferire i caratteri desiderati alla progenie. Il risultato di tali incroci è un gran numero di sementi con differenti profili genetici, ovvero una popolazione segregante. Con il passare delle generazioni, verranno selezionati all'interno di questa popolazione gli individui che presentano la migliore combinazione dei caratteri parentali. A questo scopo, a seconda della specie da selezionare, il suo tipo di riproduzione (sessuale – a impollinazione autogama o allogama, o vegetativa) ed i caratteri da selezionare, il miglioratore (o breeder) può sce-

gliere tra una vasta gamma di tecniche. Per arrivare ad una vera e propria varietà, è importante garantire che le caratteristiche desiderate siano presenti in modo stabile nella progenie, cosa che potrebbe richiedere anche 6 a 10 generazioni di selezione. Nei test ufficiali sulle varietà, le nuove candidate vengono coltivate accanto a varietà note usate come standard così da poter confrontare i caratteri. Se la varietà in fase di valutazione risulta nuova e differente da quelle standard, se i suoi caratteri sono omogenei e stabili nel tempo e se il selezionatore le ha dato un nome, la varietà può essere iscritta al registro varietale (se specie agraria sarà necessario il VCU) e/o dotata di diritti di protezione varietale secondo UPOV (vedi pag. 11).

Tecniche di selezione diverse si applicano in ognuna delle seguenti fasi del miglioramento delle piante:

- **Generazione di variabilità genetica tramite la raccolta di risorse genetiche, la mutazione e la ricombinazione tra geni** (queste ultime possono essere spontanee, nel qual caso il processo è più lento e "casuale" o indotte attraverso tecniche specifiche).
- **Selezione e riduzione della variabilità genetica favorendo quei genotipi che meglio esprimono la combinazione desiderata di caratteri.**
- Mantenimento e propagazione delle migliori varietà ottenute.

In ogni fase, esistono tecniche che agiscono a diversi livelli:

- **A livello di pianta singola intera**, di progenie o di popolazione.
- **A livello di tessuto** (parti di pianta, organi o colture cellulari).
- **A livello di cellula** (una singola cellula isolata, protoplasto, polline o cellula uovo).
- **A livello di DNA** (il DNA nucleico o extra-cromosomico).

Le tecniche possono essere anche classificate in base all'ambiente nel quale sono applicate:

- Esperimenti in campo in interazione con il suolo ed il clima.
- Esperimenti in vaso usando un substrato artificiale in condizioni standard (per esempio in serra).
- Esperimenti *in vitro* usando un mezzo di crescita artificiale in condizioni di sterilità (colture di meristemi, o di cellule fogliari).
- Esperimenti in sospensioni di cellule (per esempio colture di protoplasti).

Nelle pagine che seguono, verranno spiegate le principali tecniche di selezione e propagazione, con esempi della loro applicazione e una valutazione nel contesto dell'agricoltura biologica.

Fasi di selezione in pomodoro



1 Il fiore di una pianta selezionata di pomodoro viene emasculata...



4 La progenie viene selezionata per più generazioni secondo criteri specifici, e.g. resistenza alle malattie, gusto o produttività, per arrivare ad una nuova varietà stabile.



2 ... allo stesso tempo viene raccolto il polline di un'altra pianta selezionata.



5 Dopo un lungo periodo di prove e valutazioni, la nuova varietà viene riconosciuta, iscritta e propagata ...



3 Il polline raccolto viene trasferito sullo stigma della piante emasculata per la fecondazione. Questo incrocio artificiale pone le basi della variabilità genetica che si esprimerà nella progenie.

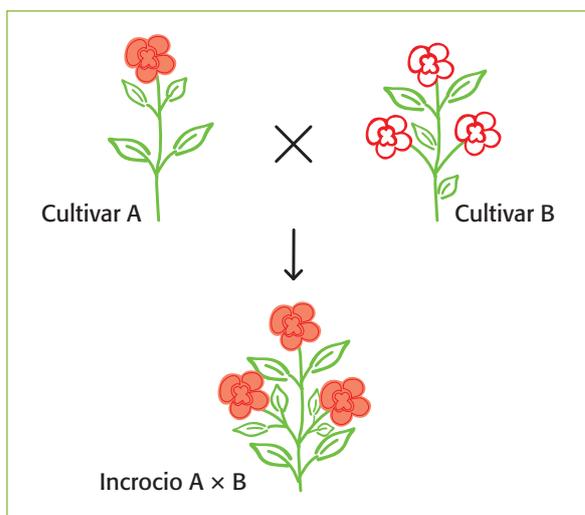


6 ... per ottenere semente commercializzabile.

1. Generazione di variabilità genetica

a: Tecniche al livello di pianta intera

Incrocio mirato all'interno di una specie



Incroci nel frumento



Preparazione del fiore (emasculazione) ...

Metodo:

Per effettuare un incrocio mirato tramite impollinazione controllata, i fiori della pianta madre vengono emasculati (eliminate le parti maschili), isolati ed impollinati a mano al momento della maturazione della parte femminile con polline raccolto dalla pianta maschile desiderata. La distribuzione del polline viene fatta tramite un pennellino o scuotendo il polline dal donatore maschile sui fiori femminili così che raggiunga lo stigma. Per questa tecnica, la sincronizzazione tra fiori del donatore e del ricevente è molto importante perché lo stigma come il polline sono ricettivi e vitali solo per poco tempo. Per ovviare a questa necessità, vengono spesso impiegate semine scalari, o in alternativa, essiccazione e congelamento del polline fino a quando la pianta madre è pronta.

Se gli incroci sono fatti con materiale non selezionato, sono necessari dei retro-incroci attraverso i quali la progenie viene incrociata nuovamente per diverse volte con i parentali originali. In questo modo, si fissano le caratteristiche desiderate.

Applicazione:

Gli incroci mirati sono molto comuni nel miglioramento genetico come mezzo per aumentare la diversità genetica creando nuove combinazioni di geni e caratteri.

Alcune di queste combinazioni saranno migliori sotto certi aspetti (resa, gusto, qualità tecnologica, o altri).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura bio:

Nessuna

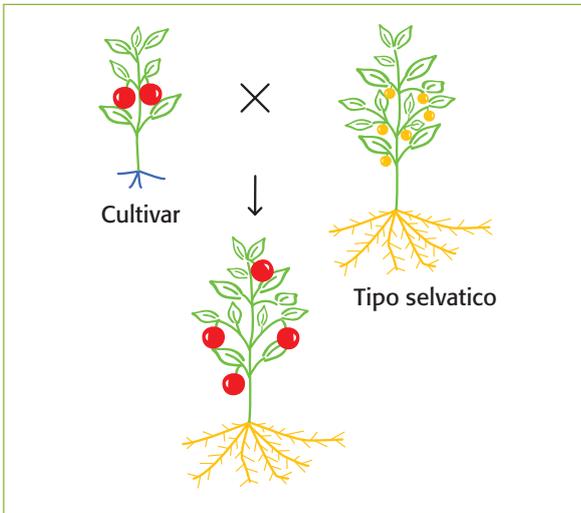


... impollinazione manuale usando polline dalla pianta prescelta come donatore ...



... e protezione delle spighe da polline estraneo tramite piccole bustine da applicare sulla spiga dopo l'impollinazione mirata.

Incrocio inter-specifico



Metodo:

Se la variabilità genetica all'interno di una specie coltivata non è sufficiente a garantire che emergano nuove combinazioni potenzialmente interessanti tramite l'incrocio tra individui al suo interno, si può ricorrere all'incrocio tra due specie diverse. Le specie imparentate (coltivate o selvatiche) possono essere incrociate tra loro in modo più o meno laborioso. Mentre specie imparentate strettamente (per esempio frumento e farro) possono essere incrociate facilmente, quando si incrociano specie più distanti tra loro si ha un ridotto sviluppo dell'endosperma nel chicco, determinando un carente sviluppo dell'embrione. Per aumentare la frequenza di embrioni vitali, si usano quindi diverse tecniche *in vitro* (vedi pag. 42).

Laddove esistano differenze nel numero di cromosomi tra le specie da incrociare, si rendono necessari vari retro-incroci per produrre una progenie fertile e geneticamente stabile. Negli incroci inter-specifici, i genomi coinvolti possono parzialmente unirsi, dando luogo spontaneamente a specie allo-ploiploidi (per esempio in frumento, colza).

La tecnica del mentor pollen consiste nel mescolare polline della pianta donatrice desiderata con polline sterilizzato (con radiazioni) proveniente dalla pianta madre dell'altra specie (mentor pollen); la presenza del polline mentor, seppur sterile, stimola lo sviluppo di un tubo pollinico, trasportando il polline fertile del donatore all'ovario per la fecondazione. Nella cosiddetta tecnica del pistillo, il pistillo della madre è parzialmente rimosso in modo che il tubo pollinico del donatore raggiunge con un percorso più breve per raggiungere e fecondare l'ovulo.

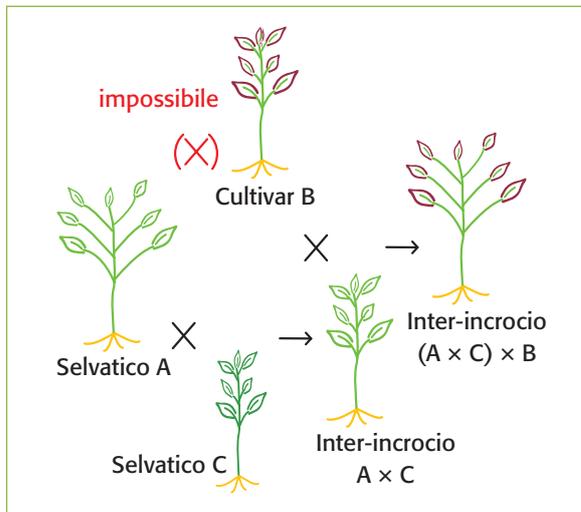
Applicazione:

Gli incroci inter-specifici tra specie diverse, generalmente imparentate tra loro sono una pratica comune, che permette di aumentare il disponibile al selezionatore. Molti geni di resistenza sono stati trasferiti da parentali selvatici a specie coltivate grazie ad incroci inter-specifici, come ad esempio la resistenza alla ticchiolatura da melo selvatico a coltivato, o la resistenza alla ruggine da graminacee selvatiche al frumento. Questa tecnica ha anche permesso lo sviluppo di nuove specie coltivate, come la canola ed il triticale, così come numerose specie di ornamentali.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Le barriere di incrocio tra specie non sempre sono chiaramente definite ma diventano sempre più invalicabili via via che aumenta la distanza genetica tra le specie da incrociare, riducendosi le possibilità di fecondazione e formazione di seme vitale.
- Interventi ulteriori, come la fecondazione *in vitro* o la coltura dell'embrione fecondato, riducono le naturali barriere di incrocio.

Incrocio ponte



Metodo:

Per superare le barriere d'incrocio tra due specie incompatibili, per esempio la specie selvatica A e la cultivar B, l'introggressione di caratteri da A a B può avvenire comunque grazie ad un terzo tipo selvatico C che sia compatibile tanto con A come con B. Prima, il selvatico A viene incrociato con il C, dopodiché le piante migliori e più promettenti vengono incrociate con la cultivar B.

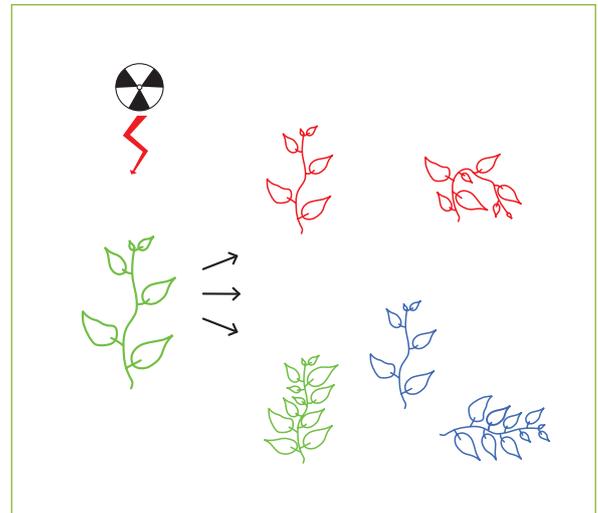
Applicazione:

Con questa tecnica, piante che sarebbero incompatibili tra loro, come per esempio alcune brassicacee, possono essere incrociate tra loro. Questo metodo può essere usato quando le caratteristiche da selezionare sono sotto un controllo genetico semplice (di singoli geni), ma è comunque laborioso e lungo. Una volta che la caratteristica desiderata è stata trasferita alla cultivar, c'è bisogno di tempo e lavoro per eliminare tutte le altre caratteristiche indesiderate trasmesse dai selvatici tramite ripetuti retroincroci.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Mutagenesi indotta

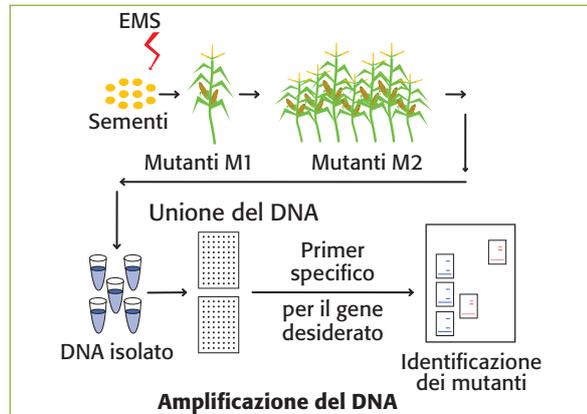


Metodo:

In natura, le mutazioni spontanee, ovvero variazioni casuali e naturali del DNA, determinano nelle piante l'apparire di nuove caratteristiche da una generazione alla successiva. Le mutazioni possono insorgere durante la divisione cellulare per esempio a causa di difetto di abbinamento tra le basi del DNA al momento della replicazione, ma possono essere anche indotte artificialmente tramite stimoli esterni fisici (radiazioni UV o di neutroni, shock termici, raggi X) o chimici (etil metansulfonato - EMS).

La mutazione può essere indotta esponendo parti di pianta (semi, polline, tuberi o apici vegetativi) o piante intere alla fonte mutagenica per aumentare il tasso di mutazione. Mentre la mutagenesi chimica tende a causare soprattutto mutazioni puntiformi (cambi in singole basi di DNA), le radiazioni ionizzanti di solito risultano in rotture cromosomiche; queste a loro volta determinano mutazioni a livello di intero cromosoma come le delezioni (perdita di cromosomi), traslocazioni o inversioni (difetti nel corretto allineamento strutturale) o duplicazioni di unità cromosomiche. In particolare il trattamento chimico con la colchicina causa la duplicazione dell'intero corredo cromosomico, ovvero una mutazione a livello genomico. Quando una mutazione avviene in un tessuto germinativo (il polline, la cellula uovo o l'embrione), è la progenie che deve essere testata per capire se la mutazione che ha ricevuto è stabile e vantaggiosa. Soltanto una piccola percentuale di piante mutanti infatti presentano un potenziale interessante per successivi stadi di miglioramento, visto che la maggior parte delle mutazioni hanno effetti negativi o letali.

Tilling



Applicazione:

La mutagenesi indotta è usata soprattutto quando si vuole migliorare un singolo carattere sotto il controllo di un solo gene. Aumentando artificialmente il tasso di mutazione casuale, aumenta anche la probabilità di generare variazioni geniche puntiformi che danno luogo a nuovi caratteri. Grazie a mutazioni che ricadono in frammenti genici responsabili della resistenza a determinate patologie, sono stati introdotti nelle piante coltivate diversi nuovi caratteri di resistenza. Negli anni Sessanta furono condotti numerosissimi esperimenti con i raggi gamma o neutroni veloci, ma oggi è la mutagenesi con agenti chimici ad essere maggiormente impiegata, risultando in più di 1800 nuove varietà, tra le quali orzi resistenti al mal bianco, orzi da malto dalla miglior qualità, cereali a taglia ridotta, colza con un miglior profilo lipidico e numerose piante ornamentali. La mutagenesi è spesso accompagnata da selezione *in vitro* per sviluppare e fissare resistenza alla salinità, ai metalli pesanti ed altri composti tossici per la pianta.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Le radiazioni ionizzanti e molti agenti mutageni chimici di sintesi non sono attualmente ammessi in agricoltura biologica e non dovrebbero essere applicati ai tessuti germinativi delle piante (cellule uovo, polline o embrioni).
- Rotture cromosomiche indotte violano l'integrità del genoma di una pianta.

Metodo:

Il TILLING (Targeted Induced Local Lesions IN Genomes – lesioni locali mirate indotte nel genoma) è un ulteriore sviluppo della mutagenesi. L'agente mutageno usato è di solito l'etil-metasulfonato (EMS), in combinazione con una tecnologia per lo screening dei genotipi risultanti, che identifica le mutazioni puntiformi avvenute in un segmento genico di interesse. Questa applicazione mirata della mutagenesi classica permette di testare in modo automatizzato un gran numero di potenziali mutanti. C'è però da dire che le mutazioni possono essere identificate soltanto in segmenti di DNA che siano già stati sequenziati. I trattamenti con agenti chimici mutageni tuttavia, oltre ad introdurre mutazioni nei punti desiderati, ne causa molte altre in tutto il resto del genoma. Pertanto, il carattere ottenuto, deve essere ritrasferito tramite retro-incrocio dalla pianta mutante alle varietà nelle quali il resto del genoma sia intatto. Una variante del TILLING è l'ECO-TILLING, che non fa uso di mutageni chimici ma usa la tecnologia associata al TILLING per sondare le varianti genetiche di uno specifico gene di interesse nelle popolazioni naturali o nelle accessioni delle collezioni di germoplasma.

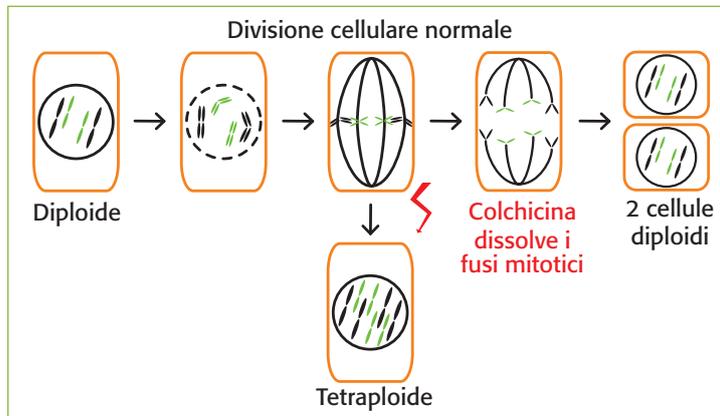
Applicazione:

La sempre maggior conoscenza delle funzioni geniche rende il TILLING un approccio molto efficiente per identificare nuovi alleli o caratteri da trasferire nel materiale che si intende sottoporre a selezione. Esempi dell'uso di questa tecnica comprendono una varietà di patata il cui amido si compone esclusivamente di amilopectina, pomodori con una maggior resistenza alla salinità, varietà di frumento senza glutine, cereali e soia tolleranti alla siccità.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- La maggior parte degli agenti chimici mutageni sono attualmente non autorizzati in agricoltura biologica e non dovrebbero essere usati sui tessuti germinativi delle piante (cellule uovo, polline o embrioni).

Poliploidizzazione



Metodo:

Nella poliploidizzazione, si verifica una moltiplicazione del numero di cromosomi di una specie a causa di una mancata divisione cellulare (mitosi). Mentre la maggior parte delle specie agricole è diploide ed ha due copie di ogni cromosoma, il loro raddoppiamento genera piante tetraploidi che hanno quattro copie di cromosomi ciascuna. Il raddoppiamento dei cromosomi coinvolge tutti i geni di un genoma ed è considerato una forma di mutazione genomica. In natura, ci sono diverse forme di poliploidia. Una distinzione va fatta tra specie auto-poliploidi, che possiedono due o più set di cromosomi omologhi derivanti dalla stessa specie (per esempio la patata tetraploide con genoma AAAA) e specie allo-poliploidi, che derivano dalla duplicazione di genomi appartenenti a specie diverse (per esempio il frumento esaploide ha tre genomi da tre specie diverse, AABBDD). La poliploidia può verificarsi spontaneamente o può essere indotta da agenti chimici che bloccano il naturale processo di mitosi, come la colchicina. Le piante che ne risultano sono di solito più vigorose e robuste, ed hanno frutti più grandi delle piante diploidi originali.

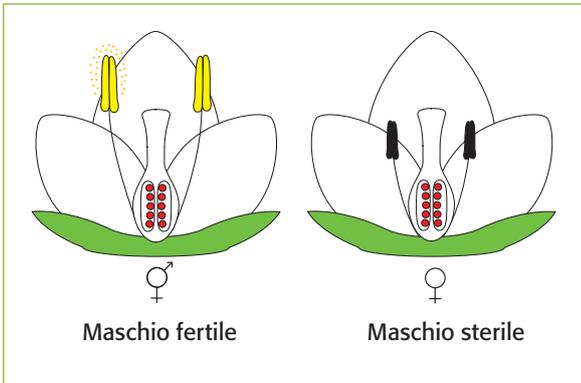
Applicazione:

La poliploidia viene indotta per ottenere piante coltivate più robuste e produttive (come è stato fatto nella segale e nel trifoglio rosso), oppure per ripristinare la fertilità di piante ottenute tramite incroci inter-specifici (per esempio il triticale, la colza ed il cotone autopoliploidi) o ancora per sviluppare piante doppie aploidi (vedi pag. 23.). Inoltre, piante tetraploidi ad impollinazione incrociata sono richieste dal mercato per la loro capacità di produrre frutta priva di semi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Se piante tetraploidi e diploidi si incrociano, la progenie triploide risulta sterile.
- Le sostanze chimiche più usate come anti-mitotiche, ad esempio la colchicina e l'erbicida oryzalin, non sono ammesse in agricoltura biologica.

Maschio-sterilità citoplasmatica (Cytoplasmic male sterility – CMS)



Metodo:

La maschio-sterilità citoplasmatica si verifica quando le parti maschili del fiore (antere, polline o gameti maschili) si sviluppano in maniera incompleta a causa di un malfunzionamento dei geni contenuti nel citoplasma, in particolare nei mitocondri. Questo malfunzionamento è causato da un disturbo nell'interazione tra genoma nucleare e mitocondriale.

In natura, la CMS è causata da mutazioni spontanee nel DNA mitocondriale. A seconda della mutazione, la produzione di polline può mancare del tutto oppure essere parziale, risultando in polline malformato o sterile (incapace di germinare). Nel miglioramento genetico, usare piante madri maschio-sterili è utile nella generazione di ibridi, in quanto garantisce, senza dover passare dalla laboriosa emasculazione manuale, che tali piante verranno impollinate esclusivamente dalla linea scelta come impollinatrice (maschile). Dato che il DNA citoplasmatico (e quindi quello mitocondriale) viene trasmesso alla progenie quasi esclusivamente dalla cellula uovo (i.e. dalla madre), la maschio-sterilità viene trasmessa all'intera progenie ibrida per ereditarietà materna. Per re-instaurare nell'ibrido ottenuto la fertilità maschile si usano di solito linee impollinatrici portatrici di cosiddetti "geni nucleari (i.e. non citoplasmici) restauratori della fertilità".

Riassumendo, per ottenere una linea ibrida usando la CMS, una linea A viene incrociata con una pianta maschio-sterile (portatrice dei mitocondri con la mutazione). I semi raccolti dalla pianta madre saranno anch'essi, a causa dell'ereditarietà citoplasmatica materna, maschio-sterili. Attraverso una serie di ripetuti retro-incroci, si ottiene una versione maschio-sterile della linea A originale. Tale linea A maschio-sterile viene poi cresciuta insieme alla linea B in modo che fioriscano allo stesso tempo; la maschio-sterilità di A garantisce che l'impollinazione avvenga esclusivamente da parte della linea B, ottenendo la progenie ibrida desiderata (AxB).

Se si desidera che l'ibrido ottenuto sia capace di produrre seme per il consumo o per la risemina, la linea B deve possedere almeno un gene nucleare (i.e. su un cromosoma) restauratore della fertilità, che possa reintrodurre la fertilità maschile nell'ibrido. In ortaggi come il cavolfiore, questo aspetto non è strettamente necessario in quanto è la cima fiorale e non il seme ad essere raccolto per il consumo.

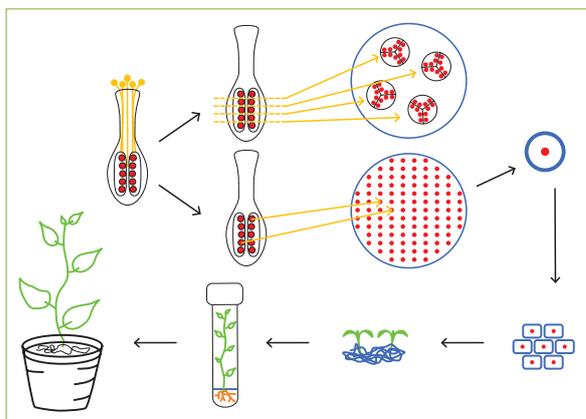
Applicazione:

La CMS è divenuta ormai fondamentale per la produzione su vasta scala di numerosi ibridi commerciali di specie quali la colza, la segale, il mais e molti ortaggi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Per quelle varietà ibride nelle quali non è stata recuperata la fertilità tramite geni restauratori, non è possibile riprodursi il seme per la risemina in anni successivi. Gli individui di queste varietà possono essere usati solo come piante madri per ulteriori operazioni di miglioramento genetico in quanto in assenza di geni restauratori la maschio-sterilità viene trasmessa alla progenie.

Colture di ovario ed embrione



Metodo:

Negli incroci inter-specifici (vedi pag. 18), l'endosperma è spesso poco sviluppato, causando un limitato apporto nutritivo all'embrione. Per aumentare il tasso di embrioni vitali ottenuti da questi incroci, si può usare la coltura dei tessuti embrionali, metodo detto anche "riscatto di embrioni". Dopo l'avvenuta fecondazione inter-specifica, l'embrione viene estratto ed isolato dal fiore e inserito su un mezzo di crescita per favorirne la germinazione, aumentando pertanto la progenie vitale.

In una variante della tecnica, sono gli ovari - interi o sezionati - contenenti cellule uovo fecondate ad essere trasferiti su un substrato di crescita perché si ingrossino e si trasformino in seme. Ad un certo stadio della loro formazione, i semi vitali vengono rimossi e coltivati a parte.

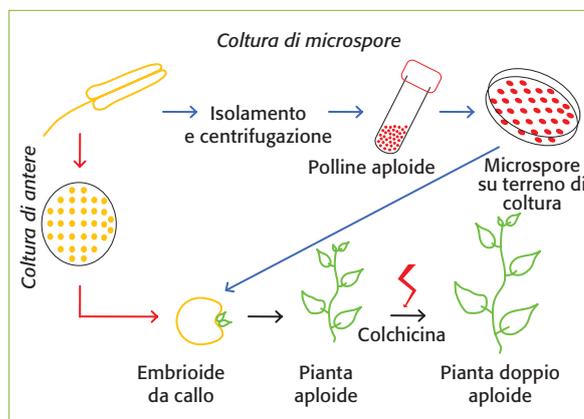
Applicazione:

Colture di ovari e di embrioni sono spesso usate per trasferire con maggior efficienza geni di resistenza tra specie strettamente imparentate. Queste tecniche hanno trovato applicazione in pomodoro, cetriolo, peperone, lattuga, frumento, triticale.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Usando la coltura *in vitro* dell'embrione dopo la fecondazione, si possono in alcuni casi superare le naturali barriere di incrocio tra specie.
- Lo sviluppo dell'embrione avviene in substrati e condizioni sterili su mezzi di crescita di sintesi.

Piante doppio aploidi



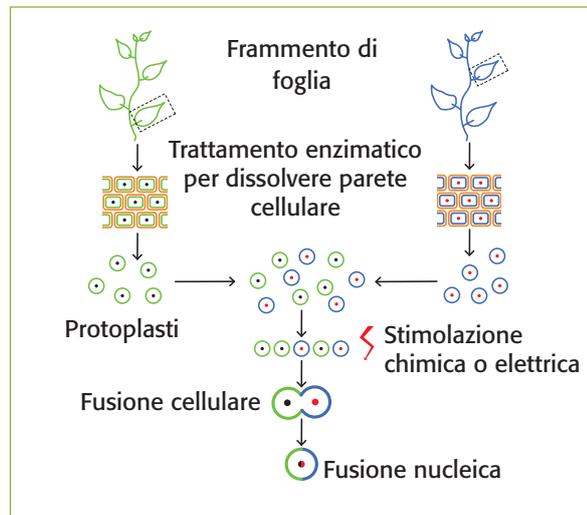
Metodo:

Una pianta doppio aploide si forma quando un complesso di cellule aploidi viene sottoposto a duplicazione dei cromosomi (poliploidizzazione artificiale).

La produzione di linee doppi aploidi permette di ottenere linee pure (inbred) omozigoti a partire da una progenie eterozigote derivante da incrocio. Tecniche di selezione tradizionali necessitano di 5-6 generazioni di ripetuta autofecondazione per raggiungere la completa omozigosi, mentre la tecnica delle piante doppi aploidi impiega una sola generazione. Visto che una pianta diploide contiene due copie cromosomiche, ognuno dei *loci* genici su questi cromosomi può quindi assumere al massimo due delle forme caratteristiche (alleli) disponibili nella popolazione a cui appartiene l'individuo. Quando il numero di cromosomi viene dimezzato, generando una pianta aploide, rimane solo uno dei due alleli per *locus*. Se il numero di cromosomi viene nuovamente raddoppiato, i due alleli ad ogni *locus* saranno identici, ed i *loci* omozigoti. Linee pure diploidi, generate in questo modo, possono essere poi autofecondate per dare origine a progenie geneticamente identica, oppure essere usate come parentali per la produzione di ibridi via incrocio.

Piante aploidi si ottengono tramite la coltura *in vitro* di antere o polline o di ovari o cellule uovo, a cui sono applicati fitormoni che stimolino la divisione cellulare. Questo risulta in una massa indifferenziata di cellule (callo) o di embrioidi, dai quali si sviluppano poi intere piante aploidi. Le piante aploidi sono vitali ma fragili e sterili; il raddoppiamento cromosomico artificiale serve quindi a re-instaurare la fertilità. A volte questo raddoppiamento avviene spontaneamente durante la fase *in vitro* ma in altri casi deve essere indotto tramite colchicina (vedi la sezione sulla poliploidizzazione, pag. 21.). Il risultato finale sono piante doppio aploidi (DH in inglese), linee pure completamente omozigoti e con un corredo cromosomico diploide. In alternativa all'uso di tecniche *in vitro*, la produzione di piante aploidi può avvenire anche *in vivo* tramite impolli-

Fusione cellulare tramite protoplasti



nazione con le cosiddette linee induttrici ("haploid inducer lines"), portatrici di un gene che induce la formazione di embrioni aploidi, senza il contributo genetico paterno.

Applicazione:

Linee doppio aploidi sono usate per velocizzare il processo di miglioramento genetico, con applicazioni importanti in orzo, mais e patata. L'ottenimento in una sola generazione di linee pure omozigoti da una progenie derivante da incrocio è di grande vantaggio in specie auto-fertili, in quanto permette di selezionare velocemente gli omozigoti con le caratteristiche desiderate.

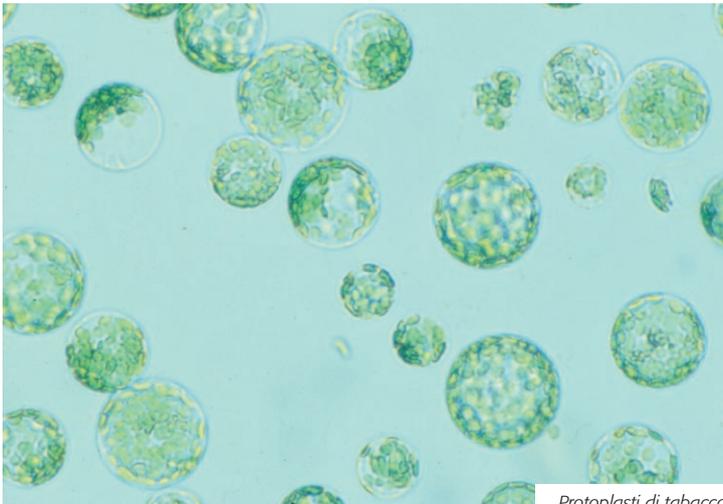
Possono essere usate anche per generare ibridi sperimentali da selezionare per il loro potenziale di incrocio.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- > Ovuli e polline vengono "riprogrammati" dai fitormoni per tornare a comportarsi come cellule somatiche; non avvenendo la fusione tra la cellula uovo ed il polline, manca la ricombinazione genetica.
- > L'uso di colchicina sintetica non è ammesso in agricoltura biologica.

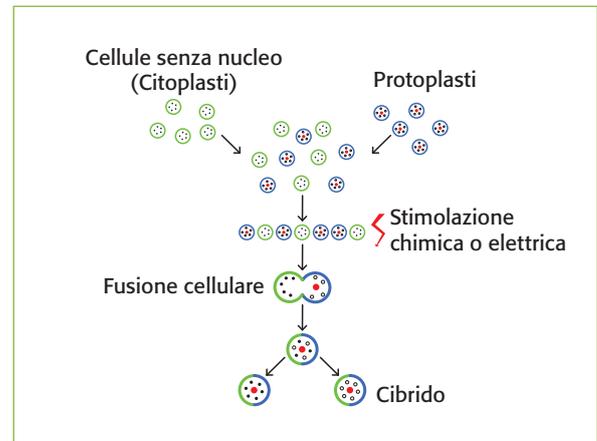
Metodo:

I protoplasti sono cellule vegetali prive di parete cellulare. Sono ottenuti trattando frammenti di foglie con appositi enzimi che dissolvono la parete e rilasciano i protoplasti in una sospensione. I protoplasti sono usati nella fusione cellulare *in vitro*, chiamata anche ibridazione somatica, in quanto le cellule coinvolte sono cellule somatiche e non gameti come avviene nell'ibridazione via riproduzione sessuale. La fusione tra protoplasti è stimolata dall'aggiunta di specifici agenti chimici (e.g. polyethylene glycol, PEG) o dall'applicazione di brevi impulsi elettrici (elettrofusione). In tal modo, due cellule con tutto il loro corredo cromosomico nucleare e citoplasmatico, vengono unite senza meiosi né formazione di gameti, ovvero senza quella riduzione nel numero di cromosomi di ogni genitore che avviene nella riproduzione sessuale. Pertanto, il prodotto della fusione è di solito un primordiale organismo tetraploide (sotto forma di callo) che contiene sia il DNA nucleare sia gli organuli citoplasmatici (cloroplasti e mitocondri) di entrambe le cellule originali. Nell'incrocio naturale, solo il citoplasma materno viene trasmesso alla progenie. Inoltre, nel processo di produzione di ibridi somatici, i cromosomi e gli organuli di entrambi i parentali si mescolano dando origine a numerose nuove combinazioni. Dopo aver selezionato le combinazioni più interessanti, i prodotti della fusione (i calli) vengono sottoposti a trattamenti per rigenerare le pareti vegetali e messi a crescere su substrati artificiali secondo tecniche di coltura dei tessuti.



Protoplasti di tabacco

Fusione cellulare tramite citoplasti



Applicazione:

La fusione di protoplasti permette di creare rapidamente ibridi interspecifici senza passare dalla coltura di embrioni o dall'incrocio ponte (pag. 19). Nella fusione intra-specifica l'informazione genetica delle due piante può essere combinata a piacimento; ciò è particolarmente rilevante per i caratteri monogenici come quelli di resistenza o per combinare caratteri determinati da geni nucleari con quelli sotto il controllo di geni citoplasmatici.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- La fusione cellulare tramite protoplasti può andare oltre le naturali barriere di incrocio tra specie.
- L'integrità della cellula è compromessa dalla fusione forzata di due protoplasti.
- Organuli di piante diverse si ritrovano nello stesso organismo, fenomeno estremamente raro ed improbabile in condizioni naturali. Questo può determinare variazioni nella regolazione genica tra il genoma nucleare e quello extra-cromosomico.
- Se organismi tetraploidi prodotti dalla fusione si incrociano nuovamente con piante diploidi, danno origine a organismi triploidi sterili.

Metodo:

In questa tecnica, la fusione cellulare avviene nello stesso modo che nella fusione tramite protoplasti. Al contrario di questa, però, il nucleo di uno dei protoplasti da fondere viene distrutto, di solito usando raggi X. Ciò che rimane è un "citoplasto", che non contiene alcun cromosoma nucleare intatto, ma solo i costituenti citoplasmatici (mitocondri e cloroplasti). Un citoplasto è quindi fuso con un protoplasto, per ottenere i cosiddetti ibridi (dall'inglese cybrid, contrazione di cytoplasmic hybrid). Questa fusione viene chiamata anche fusione cellulare asimmetrica e il suo scopo è quello di trasmettere plastidi extra-nucleari e DNA mitocondriale da una specie all'altra senza cambiare i geni del nucleo. Se per esempio protoplasti di broccolo sono fusi con citoplasti di radicchio, l'interazione tra il DNA mitocondriale del radicchio ed i geni nucleari del broccolo rischia di produrre piante maschio sterili.

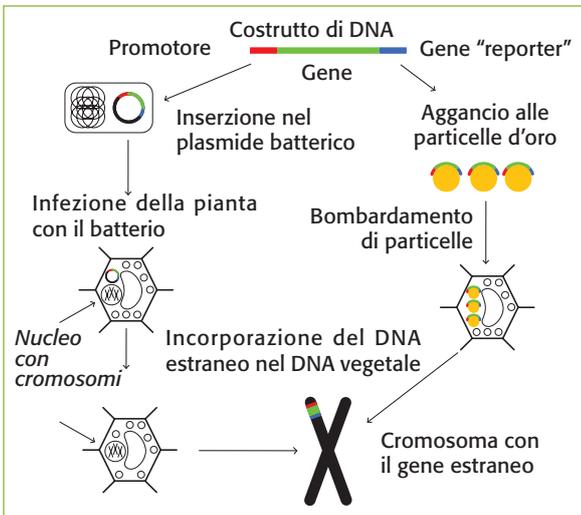
Applicazione:

Con la fusione tramite citoplasti, è possibile creare combinazioni tra un nuovo DNA citoplasmatico ed il DNA nucleare esistente, permettendo la trasmissione controllata di geni citoplasmatici. Questo metodo è usato per indurre maschio-sterilità citoplasmatica (in cavolfiore e broccolo) oppure per introdurre resistenze a patogeni o parassiti da parentali selvatici a specie coltivate (in patata e riso).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- L'integrità di specie è compromessa dalla fusione forzata di cellule provenienti da specie differenti.
- Organuli di piante diverse si ritrovano nello stesso organismo, fenomeno estremamente raro ed improbabile in condizioni naturali. Questo può determinare variazioni nella regolazione genica tra il genoma nucleare e quello extra-cromosomico.
- Non vengono rispettate le naturali barriere di incrocio tra specie.

Trasferimento di geni per la produzione di piante transgeniche



Metodo:

L'obiettivo del trasferimento di geni è quello di introdurre in una varietà una nuova caratteristica che non era presente nel materiale di partenza. Un prerequisito essenziale per far questo è identificare ed isolare i geni desiderati, creando un cosiddetto "costrutto di DNA". Nel costrutto, la sequenza di DNA del gene da trasferire (il gene target) viene legata ad un promotore che controlla l'espressione del gene e ad un gene "reporter" che indicherà se il trasferimento del gene target è avvenuto con successo. Come reporter vengono usati geni di resistenza a erbicidi o antibiotici: cellule in cui il trasferimento del gene target avviene con successo acquisiscono tale resistenza, riuscendo a prosperare in un mezzo di crescita dove è stato aggiunto l'erbicida o antibiotico che ucciderebbe cellule non modificate.

Il trasferimento del costrutto genico al nucleo della cellula di destinazione e la sua incorporazione nel DNA della pianta può avvenire tramite metodi diretti o indiretti. Nei primi, il costrutto è inserito direttamente nella cellula, tramite bombardamento di micro-particelle oppure tramite endocitosi. Nel primo caso, particelle di oro o tungsteno, dopo essere state imbevute di DNA, vengono sospinte ad aria compressa in una sospensione cellulare o direttamente sui tessuti vegetali. Nell'endocitosi, viene creata una sospensione di protoplasti a partire dalle cellule obiettivo (private quindi dei nuclei) ed a questa sospensione viene poi aggiunto il costrutto; la membrana dei protoplasti viene resa temporaneamente permeabile grazie all'uso di agenti chimici, elettrici o shock termici, così che il DNA da trasferire possa entrare dalla soluzione all'interno delle cellule. Da queste cellule vengono poi ottenute piante intere per rigenerazione. Nei metodi indiretti, si usa la mediazione del batterio *Agrobacterium tumefaciens*: il costrutto viene incorporato nel DNA batterico e successivamente le cellule vegetali vengono "infettate".

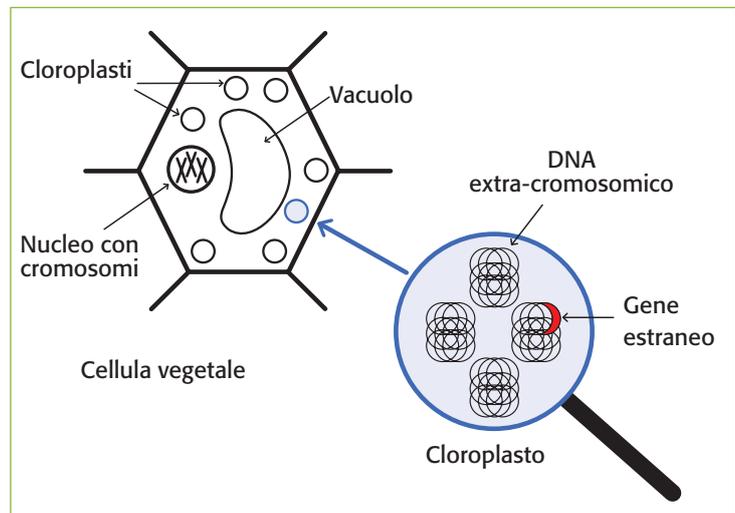
L'integrazione del costrutto avviene in una posizione casuale nel genoma, ed è possibile che vengano incorporate diverse copie. Inoltre, possono verificarsi degli effetti cosiddetti "di posizione", come il silenziamento di un gene o l'alterazione dell'espressione di geni vicini. Secondo il tipo di costrutto, il gene trasferito può venire espresso in tutte le cellule della pianta, o può esprimersi in organi specifici o in specifici processi di sviluppo, a seconda del gene promotore a cui è associato il costrutto. Anche quando la trasformazione va a buon fine, il costrutto genico non viene sempre espresso. Spesso questa mancanza di espressione viene attribuita ad una interferenza da parte del RNA (vedi pag. 30). Di conseguenza, le piante trasformate devono essere testate accuratamente in campo per confermare l'effettiva espressione del gene trasferito. Inoltre, le piante transgeniche ottenute devono essere retro-incrociate diverse volte prima di poter essere commercializzate. Possono essere trasferiti sia geni singoli che multipli allo stesso tempo: per esempio, un mais transgenico può essere portatore di un gene per la resistenza ad un erbicida e diversi geni *Bt* (*Bacillus thuringiensis*, vedi sotto) contro una serie di parassiti.

Applicazione:

Caratteri monogenici possono essere trasferiti tra specie tramite la tranguenesi. Un esempio è il gene *Bt*, proveniente dal batterio *Bacillus thuringiensis* e trasferito con successo in mais, cotone, soia ed altre colture per proteggere le piante dai danni di insetti patogeni. Il trasferimento tramite *Agrobacterium* funziona molto bene in piante dicotiledoni come tabacco, colza, soia e cotone. Il trasferimento tramite bombardamento di particelle è usato soprattutto in cereali monocotiledoni come il mais, il frumento e riso, dove non risulta efficace il metodo mediato dall'*Agrobacterium*.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Organismi geneticamente modificati non sono ammessi in agricoltura biologica.
- L'integrità del genoma vegetale viene distrutta e le barriere di fertilità non sono rispettate.
- Esiste un potenziale rischio di contaminazione via impollinazione incrociata di altri organismi, cosa che crea un problema di coesistenza con piante non modificate in aree ristrette.
- La pianta è ridotta ad un conglomerato di frammenti di DNA che vengono sempre più assoggettati a brevetti, impedendo il riuso del seme ed il proseguimento degli sforzi di miglioramento e selezione. In tal modo, si consolidano i monopoli nel settore sementiero e si riduce la diversità biologica.

Cis-genesi**Trasformazione plastidica****Metodo:**

La cis-genesi usa gli stessi metodi descritti nella sezione precedente sulle piante transgeniche. La differenza risiede nel fatto che il gene isolato, il suo promotore ed il suo "reporter" vengono dalla stessa specie e pertanto non violano nessuna barriera di specie.

Applicazione:

La cis-genesi è usata soprattutto in piante a propagazione vegetativa per il trasferimento di caratteri monogenici (e.g. resistenza a patogeni) da parentali selvatici o specie affini ma di scarso interesse agronomico. Questo trasferimento non cambia gli altri caratteri della varietà di destinazione. Attraverso tale trasferimento di geni singoli, si può migliorare un unico aspetto di una specie o varietà esistente, senza introdurre altri geni come succedrebbe nelle tecniche tradizionali di incrocio e selezione. Si riesce quindi ad evitare il fenomeno conosciuto come "linkage drag", il trasferimento di geni non desiderati localizzati sullo stesso cromosoma del gene target.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Organismi geneticamente modificati non sono ammessi in agricoltura biologica.
- Anche in piante cis-geniche, il DNA della pianta trasformata è modificato direttamente e l'integrità del genoma nucleare è disturbata.

Metodo:

Nella trasformazione plastidica, il costrutto non è integrato nel genoma nucleare della cellula di destinazione, ma piuttosto nel genoma extra-cromosomico dei plastidi (cloroplasti o mitocondri). Uno dei vantaggi della trasformazione tramite plastidi è l'alto livello di espressione genica grazie al gran numero di copie di geni plastidici presenti in ogni cellula. Inoltre, i geni plastidici sono sotto un controllo diverso da quello dei geni cromosomici e di conseguenza non c'è rischio di silenziamento a causa di interferenze del RNA (vedi pag. 30). Infine, più geni possono essere trasmessi simultaneamente e visto che i plastidi hanno una trasmissione quasi esclusivamente materna, il rischio di trasmissione orizzontale del trans-gene tramite l'impollinazione è inferiore che nel caso di piante che portano il trans-gene nel nucleo.

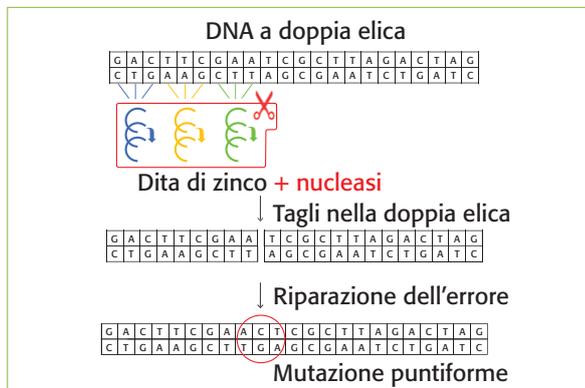
Applicazione:

Ad oggi, questo metodo è stato applicato con successo solo in tabacco, per produrre bioplastiche.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Piante geneticamente modificate non sono ammesse in agricoltura biologica.
- L'integrità del DNA nucleare è mantenuta, ma il DNA extra-cromosomico viene alterato, violando il principio di integrità cellulare.

Genome editing – Mutagenesi sito-specifica indotta da nucleasi a dita di zinco (ZFN)



Metodo:

Si tratta di un metodo di "genome editing". Le nucleasi a dita di zinco (ZFN) sono costituite da una frazione proteica, cosiddetta "motivi a dita di zinco" e da una enzimatica, le nucleasi. I motivi a dita di zinco sono specifiche regioni proteiche in grado di legare il DNA, mentre le nucleasi sono in grado di tagliare la doppia elica. Combinando diversi motivi a dita di zinco, il DNA viene tagliato in punti specifici piuttosto che in posizioni imprevedibili e casuali; la naturale reazione di riparazione della pianta determina meccanismi di sostituzione o slittamento delle basi del DNA, risultando in un cambiamento o nella perdita di funzionalità genetica. Con questo metodo, non c'è inserimento di alcun frammento esogeno di DNA, ma solo della ZFN, che viene trasferita per elettroporazione o tramite *Agrobacterium*. Le ZFN possono d'altra parte essere associate a corte sequenze di DNA isolato (oligonucleotidi), che vengono usate come modelli per la riparazione genica a carico della pianta dopo il taglio della doppia elica, determinando un'alterazione più guidata del DNA (vedi sezione successiva). Associando le ZFN a costrutti genici contenenti geni funzionali estranei, tali geni vengono inseriti esattamente nel sito del genoma riconosciuto e tagliato dalle ZFN. Questa variante aumenta l'efficienza del trasferimento genico ed allo stesso tempo previene i cosiddetti effetti "di posizione".

Applicazione:

Il metodo è stato usato per disattivare dei geni in mais e tabacco. E' la variante combinata con il costrutto genico che viene considerata di maggior potenziale nel miglioramento genetico vegetale. Grazie all'alta specificità dei motivi a dita di zinco, si può assumere che tutte le copie geniche della cellula trattata subiranno delle mutazioni. Questo è particolarmente vantaggioso in specie poliploidi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Le ZFN sono molecole di sintesi che non si trovano in natura
- Quando le ZFN vengono inserite nel nucleo, l'integrità della cellula viene compromessa.

Genome editing - TALEN

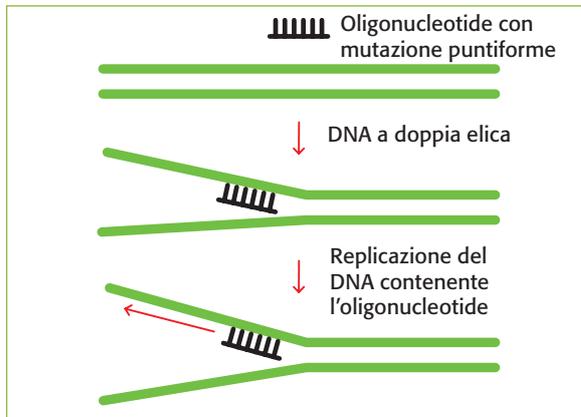
Metodo:

I TALEN (nucleasi effettori simili agli attivatori della trascrizione) sono enzimi di restrizione artificiali, che come le ZFN sono creati per tagliare specifiche sequenze del DNA e causare inserzioni o delezioni innescando un meccanismo di riparazione che finisce per modificare definitivamente la sequenza genica.

Applicazione:

I costrutti TALEN sono usati alla stregua delle ZFN, ma col vantaggio di una maggiore specificità nel riconoscere il sito specifico di attacco sul DNA target e di minore probabilità di errori.

Genome editing – Mutagenesi indotta da oligonucleotidi



Metodo:

Questo tipo di mutagenesi consiste nel trasferimento di un frammento specifico di DNA che causa una modifica selettiva del DNA target in un punto determinato (è un tipo di mutagenesi sito-specifica ovvero di "genome editing"). Una sequenza corta di DNA o RNA sintetici (da 20 a 100 basi, cioè un oligonucleotide) viene immessa in una cellula tramite elettroporazione, trattamento con polietilenglicole (PEG) o bombardamento di particelle. L'oligonucleotide contiene la mutazione puntiforme che si desidera trasferire alla cellula di destinazione e si comporta a guisa di "primer", cioè da stampo per generare tale mutazione nella pianta target. A trasferimento avvenuto, il frammento primer viene degradato tramite enzimi di restrizione in modo che non sia più rintracciabile nella cellula.

Con questa tecnica ci sono molti meno effetti collaterali rispetto alla mutagenesi convenzionale dove le mutazioni vengono indotte in maniera completamente casuale.

Applicazione:

La mutazione indotta da oligonucleotidi è usata per incorporare un cambio specifico in una sequenza di DNA nota, in modo da migliorare un carattere specifico. Il tasso di successo è molto maggiore rispetto alla mutagenesi non sito-specifica, in quanto soltanto il gene target viene assoggettato a mutazione. D'altro canto è necessario conoscere il gene da trasformare e la mutazione che determinerà il cambio favorevole. Grazie a questa tecnica, si sono ottenute linee sperimentali di orzo (mutanti *mlo*) resistenti a una vasta gamma di varianti di oidio.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Piante geneticamente modificate non sono ammesse in agricoltura biologica.
- Le sequenze isolate di DNA vengono introdotte nel nucleo attraverso un intervento.

Genome editing – CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

Metodo:

L'uso del CRISPR associato all'enzima CAS9 (CRISPR/CAS9) è la tecnica di genome editing che si sta maggiormente affermando per semplicità d'uso. I CRISPRs sono elementi genetici che i batteri usano come agenti di immunità contro i virus. Consistono in brevi sequenze ripetute che hanno origine da genomi virali e sono state incorporate nel genoma batterico. In questa tecnica vengono usati come guide per posizionare l'enzima CAS9. Quest'ultimo è presente nel batterio *Streptococcus pyogenes* e fa parte della grande famiglia delle nucleasi, cioè enzimi in grado di tagliare il DNA. Una volta raggiunto il sito bersaglio grazie al complesso che forma con il CRISPR, CAS9 taglia il DNA: tale rottura viene riparata dalla cellula con conseguenze che possono essere diverse a seconda della modalità in cui la tecnologia viene usata. Convenzionalmente si distinguono tre modi di utilizzo, a seconda di quanto e come si vuole indirizzare il meccanismo di riparo, indicati rispettivamente con le sigle SDN-1, SDN-2 ed SDN-3, in cui SDN è l'acronimo per Site Directed Nuclease (nucleasi sito diretta). Nella modalità SDN-1 si taglia il DNA ma non si interferisce in altro modo col meccanismo di riparazione che pertanto è casuale (si usa di solito semplicemente per disattivare un gene). Nelle altre modalità si immette anche una molecola che fa da stampo per la riparazione del DNA (SDN-2) o addirittura che si integra nel DNA ospite (SDN-3), dirigendo così la correzione in maniera sempre più mirata tanto da ottenere di fatto nella modalità SDN-3 una pianta trans- o cis-genica.

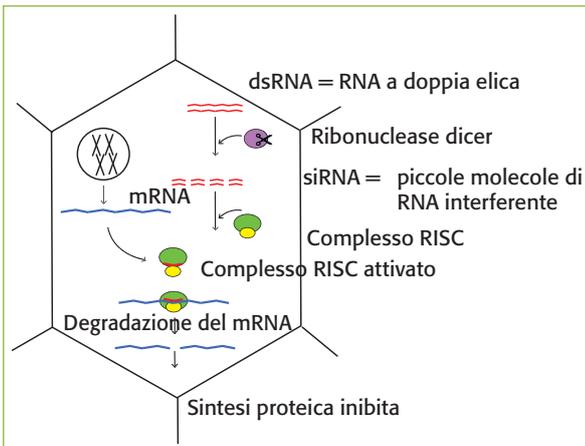
Applicazione:

Mediante il CRISPR si può generare in una varietà coltivata una qualsiasi mutazione favorevole che sia stata individuata in selvatici o specie affini, senza introdurre nuovi geni, by-passando le lunghe pratiche di incrocio e reinrocio ed evitando che la nuova pianta contenga altre porzioni del genoma della specie donatrice oltre al gene che si desidera trasferire. Viene proposta come particolarmente promettente per le specie arboree che hanno tempi di generazione di diversi anni ed in cui i tempi di selezione e miglioramento "tradizionali" si allungano notevolmente.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Piante geneticamente modificate non sono ammesse in agricoltura biologica
- Agenti mutageni e molecole stampo (o isolati di DNA) vengono introdotte nel nucleo, violando l'integrità naturale e funzionale della cellula.

Silenziamento genico – interferenza del RNA (RNAi)



Metodo:

L'interferenza del RNA (RNAi) è un meccanismo di regolazione genica nelle piante, gli animali e gli esseri umani che causa una disattivazione della traduzione di un gene a proteina a livello cellulare. La RNAi è messa in moto da piccole molecole a doppia elica di RNA (siRNA) che causano una modifica nel promotore del gene e quindi l'inibizione della trascrizione da DNA a RNA, o la degradazione del mRNA e pertanto l'inibizione della traduzione da mRNA a proteina. La sequenza di DNA del gene rimane invariata – è l'espressione del gene che viene impedita: pertanto si parla di effetto epigenetico.

Per silenziare l'espressione di certi geni, si inseriscono nel genoma tramite elettroporazione o bombardamento di particelle dei costrutti genici (chiamati secondo l'acronimo inglese RISC, complesso silenziatore indotto da RNA) contenenti il corrispondente DNA o RNA senso o antisense. Quando il costrutto viene trascritto, esso causa un ripiegamento a forcina dei filamenti di mRNA, formando molecole di RNA a doppia elica. Queste ultime, non potendo essere tradotte perché a doppia elica (ossia "complete"), attivano l'interferenza, rendendo impossibile la formazione della proteina codificata dal gene in questione e venendo rapidamente degradate.

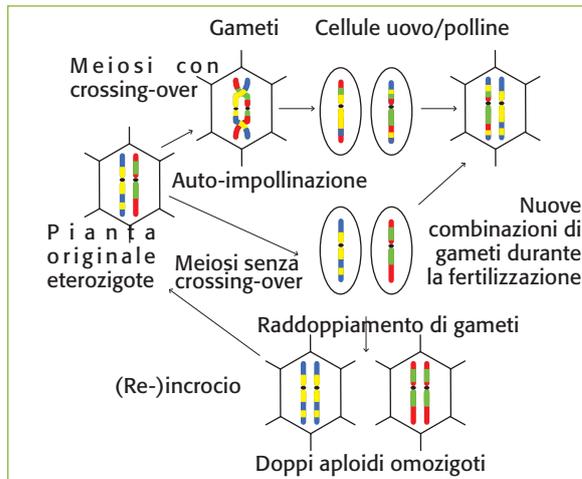
Applicazione:

La tecnica di inserire piccoli frammenti di RNA nelle cellule vegetali è molto usata a livello sperimentale, per determinare l'effetto sulla regolazione genica. Può anche essere usata per influenzare l'espressione di certi prodotti genici il cui percorso di sintesi sia noto e le cui caratteristiche finali possano essere modificate tramite il silenziamento di specifici enzimi. Il grande vantaggio dei metodi del RNAi è che l'effetto post-trascrizione è ereditato in modo dominante, cioè indipendentemente dal numero di copie del gene silenziato esistano nel genoma, il suo effetto viene completamente soppresso e non si ottiene nessuna proteina.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Piante geneticamente modificate non sono ammesse in agricoltura biologica.
- Sequenze di DNA o RNA vengono inserite nel nucleo tramite una tecnologia che viola l'integrità funzionale della cellula.
- E' stato osservato che un intervento a base di RNAi può influire sull'espressione di caratteri controllati da altri geni rispetto al target.
- Ad oggi, esistono pochi dati sui possibili rischi della tecnica.

Selezione inversa



Metodo:

Nella selezione inversa, il processo di creazione di un ibrido è invertita: la tecnica si propone di riprodurre una progenie geneticamente uniforme a partire da una pianta eterozigote selezionata per avere tutte le caratteristiche desiderate. Questo non sarebbe naturalmente possibile in quanto al momento dell'autofecondazione di una pianta eterozigote i geni si ricombinano durante la meiosi. Pertanto, un ibrido si può autofecondare, ma i caratteri della progenie segregherebbero ampiamente generando molte nuove combinazioni.

La selezione inversa inibisce la ricombinazione sopprimendo gli eventi di crossing-over meiotico e suddivide quindi gli ibridi in componenti ereditari riproducibili. La ricombinazione è soppressa usando la RNAi (vedi sezione precedente) mentre la tecnologia dei doppi aploidi è usata per creare linee pure omozigoti in un unico passaggio. Queste ultime possono essere autofecondate ripetutamente per incrementare il numero di individui oppure reincrociate tra loro per ottenere di nuovo esattamente l'ibrido di partenza.

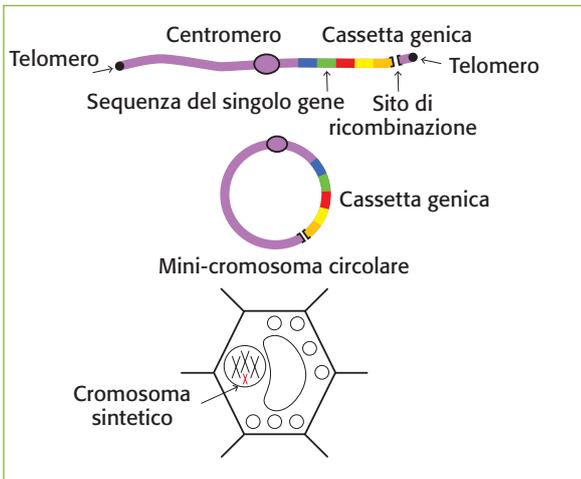
Applicazione:

Per le specie nelle quali non esistono molti materiali di base per il miglioramento genetico, la selezione inversa può facilitare il processo di sviluppo varietale. In questi casi, infatti, le caratteristiche favorevoli di individui eterozigoti possono essere propagate anche senza un'esatta conoscenza della loro costituzione genetica. Inoltre, quando la selezione inversa viene applicata agli eterozigoti F1, è possibile generare linee di sostituzione cromosomica che consentono di studiare e selezionare geni localizzati su specifici cromosomi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Frammenti di RNA estranei vengono introdotti nel nucleo in modo artificiale, violando l'integrità funzionale della cellula.
- La selezione inversa interferisce con il controllo dell'espressione genica, e disturba l'organizzazione interna della cellula.
- La varietà ibrida dev'essere ogni volta ricreata a partire dalle sue singole componenti ereditarie. La risemina del materiale ibrido ottenuto implica quindi un declino nella performance.

Trasformazione tramite mini-cromosomi



Metodo:

Per incorporare un buon numero di nuovi geni nel genoma di una pianta, si può trasferire un intero gruppo di costrutti genici artificiali tramite la tecnica dei "mini-cromosomi".

I mini-cromosomi si preparano in due modi diversi: raccorciando i cromosomi naturali, oppure sintetizzando *ex novo* tutti i componenti funzionali di un cromosoma naturale. Di conseguenza, il gene desiderato è inserito nei mini-cromosomi ed introdotto nel nucleo della cellula. Nella maggior parte dei casi, anche i siti di ricombinazione vengono trasferiti per permettere di integrare ulteriori costrutti genici in un secondo momento.

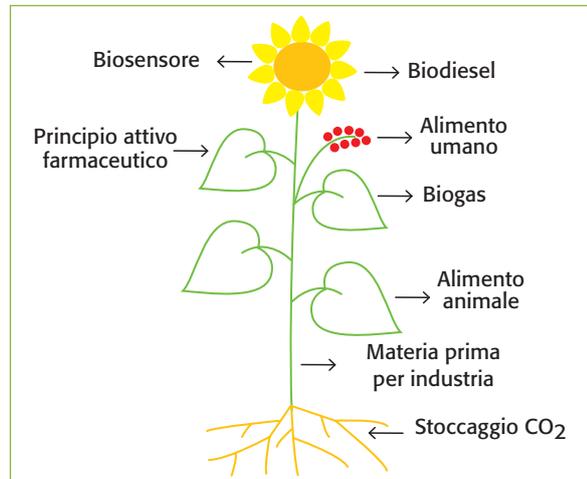
Applicazione:

Questo metodo è utile quando si vogliono inserire in una varietà molti costrutti genici o interi processi metabolici nuovi per scopi industriali o farmaceutici. I mini-cromosomi non vengono incorporati nei cromosomi esistenti, ma anzi contengono tutti i componenti necessari ad esistere autonomamente con i set cromosomici nativi, evitando quindi effetti di posizione indesiderati. I geni localizzati sui mini-cromosomi mostrano un'espressione ed un'ereditabilità stabili. Fino ad ora, il metodo è stato usato soprattutto per aumentare la produzione di biomassa.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Organismi geneticamente modificati non sono ammessi in agricoltura biologica.
- L'integrità del genoma della pianta è compromessa.
- La pianta è ridotta ad un puro contenitore per lo svolgimento di certe vie metaboliche.
- Questa tecnica apre la strada alla biologia di sintesi (vedi metodo successivo).

Biologia di sintesi



Metodo:

La biologia di sintesi permette di creare nuove architetture di DNA. Singoli componenti come i nucleotidi o gli aminoacidi vengono riassemblati o sintetizzati senza un precursore naturale. Ad oggi, la ricerca in biologia di sintesi è centrata soprattutto sulla sintesi di batteri che vengono poi impiegati per produrre enzimi in quantità e qualità. In questo caso, il DNA della cellula batterica è sostituito da un genoma sintetico. A livello di ricerca di base è già possibile creare mini-cromosomi vegetali artificiali (vedi metodo precedente) e sintetizzare nuovi cloroplasti.

Applicazione:

Le prime applicazioni sono limitate alla creazione di organismi batterici relativamente semplici. Rispetto ad altri metodi di ingegneria genetica, piuttosto che costruire nuovi segmenti genici (per esempio trasferire un gene da un batterio al genoma di una pianta di mais), la biologia di sintesi può produrre interi geni e genomi a partire da singole componenti chimiche e grazie a dei modelli computerizzati. In tal modo, si producono sequenze di DNA senza uno stampo o un modello naturale e si possono quindi creare nuove proteine. La ricerca sta lavorando sulla generazione di nuove sostanze tramite modelli artificiali di DNA batterico.

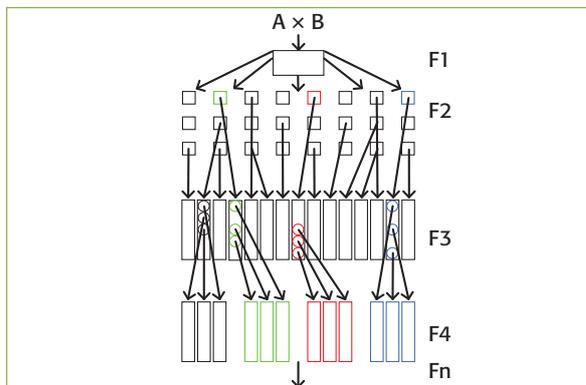
Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Organismi geneticamente modificati non sono ammessi in agricoltura biologica.
- Questo metodo solleva questioni etiche sull'illusione di onnipotenza da parte dell'uomo e la riduzione di un organismo vivente alla mera somma dei suoi componenti molecolari. La biologia di sintesi rappresenta un intervento molto estremo nella creazione della vita.

2. Selezione

a: Tecniche a livello di pianta intera

Selezione fenotipica in campo



Metodo:

Nel miglioramento genetico si fanno passi avanti nella direzione degli obiettivi di selezione stabiliti, identificando ad ogni generazione le piante migliori o la loro progenie. Queste vengono portate avanti, valutando via via la loro performance in campo in base agli obiettivi di selezione.

La selezione fenotipica su piante singole è soggetta a grandi errori statistici, visto che gli effetti del genotipo sono mascherati dall'influenza dell'ambiente. Col passare delle generazioni di selezione, si accumulano sempre più dati sulle linee migliori che vengono portate avanti, permettendo al miglioratore di prendere decisioni più mirate sul prosieguo della selezione. Questo si traduce nel fatto che la selezione fenotipica nelle prime generazioni è meno efficace di quella nelle generazioni successive. E' comunque improbabile riuscire ad identificare una singola pianta che riunisca tutte le caratteristiche desiderate, soprattutto considerando le grandi aspettative che si hanno su una varietà "ideale". Compito del selezionatore è piuttosto quello di trovare il miglior compromesso usando la variabilità disponibile.

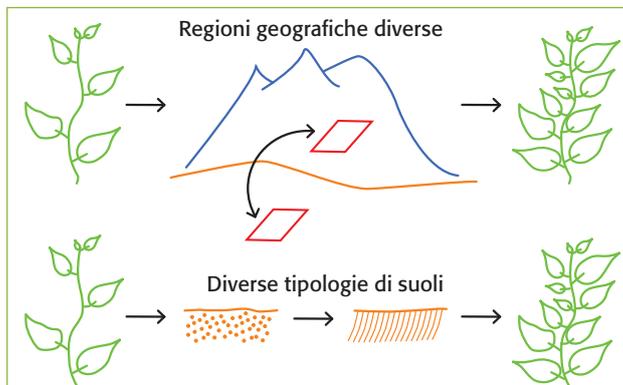
Applicazione:

La selezione a livello fenotipico è un passaggio essenziale di qualunque metodo o programma di miglioramento genetico.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Per l'agricoltura biologica, l'interazione di una pianta con il suolo e le condizioni climatiche è un requisito essenziale per lo sviluppo di piante localmente adattate e resilienti.
- Tutti i passaggi della selezione fenotipica devono svolgersi in condizioni agronomiche biologiche.

Shuttle breeding



Metodo:

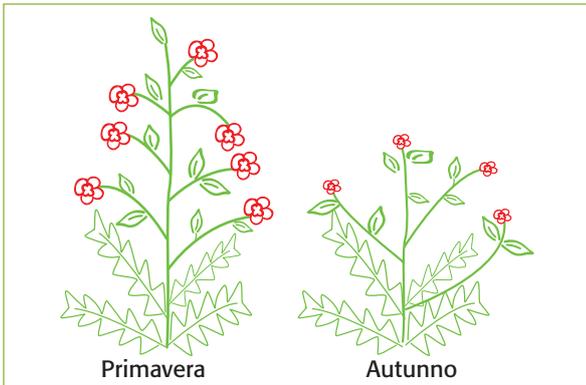
Questo approccio prende il nome di "shuttle breeding" (letteralmente "selezione navetta") per la sua caratteristica di trasferire più volte materiale vegetale da un ambiente ad un altro). Un esempio pratico è quello di far crescere la prima selezione della progenie in un ambiente asciutto, la generazione successiva in un ambiente umido, la terza in un ambiente esposto a stress idrico, e così via.

Applicazione:

Il metodo viene utilizzato oltre che per promuovere l'adattamento a caldo, freddo, siccità, asfissia, acidità, salinità, etc. anche per migliorare la resistenza a diversi parassiti e malattie. Viene impiegato soprattutto nelle prime generazioni di selezione; in fasi più tardive, si è accumulato abbastanza seme da poter condurre esperimenti in parallelo in diverse località. Più i diversi ambienti di selezione assomigliano agli ambienti di coltivazione a cui la varietà è destinata, maggiore sarà il successo del programma.

Quando le varie località di valutazione hanno condizioni climatiche, di suolo e di pressione biotica estremamente diverse tra loro, il risultato spesso sono varietà capaci di adattarsi ad una serie abbastanza ampia di condizioni ambientali (è con metodi del genere che si ottengono le cosiddette varietà multi-regionali a resa stabile). Se si seleziona all'interno di regioni delimitate e su terre coltivate in biologico, aumentano le probabilità di ottenere varietà ben adattate a siti specifici e ad un determinato tipo di conduzione aziendale (le cosiddette varietà localmente adattate), anche se possibilmente meno adatte a gestioni ad alta intensità di input.

Cambio dell'epoca di semina



Metodo:

Cambiare l'epoca di semina può aiutare a selezionare caratteri come la sensibilità al fotoperiodo, le necessità di luce o calore che determinano l'epoca di fioritura o la stabilità delle rese o della qualità.

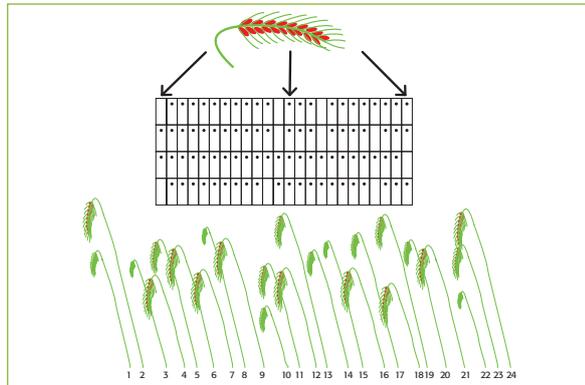
Applicazione:

Questo metodo è usato soprattutto nei cereali, per esempio per sviluppare varietà di frumento che possano essere usate tanto come autunno-vernine che come primaverili.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Metodo spiga-fila



Metodo:

Nel metodo della spiga-fila, tutte le cariossidi di una spiga di cereale vengono seminate nello stesso ordine in cui erano disposte sulla spiga. Pertanto, la posizione delle piante sulla fila riflette l'ordine delle spighe sulla spiga, e la qualità di sviluppo di quest'ultima.

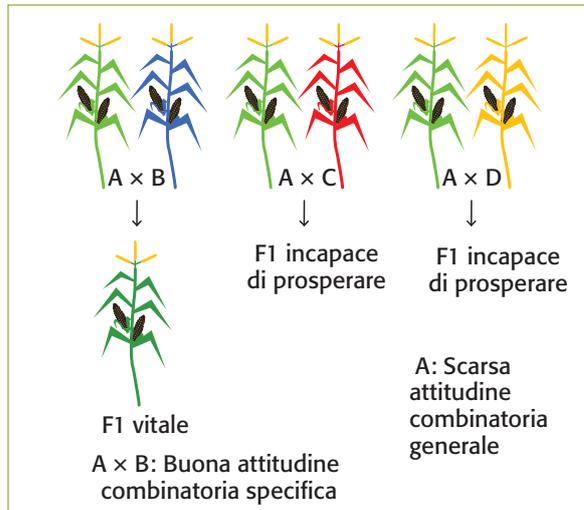
Applicazione:

Il metodo fu sviluppato da coltivatori biodinamici di cereali, per aumentare l'efficienza e l'accuratezza della valutazione e selezione delle progenie di ogni pianta ad ogni generazione.

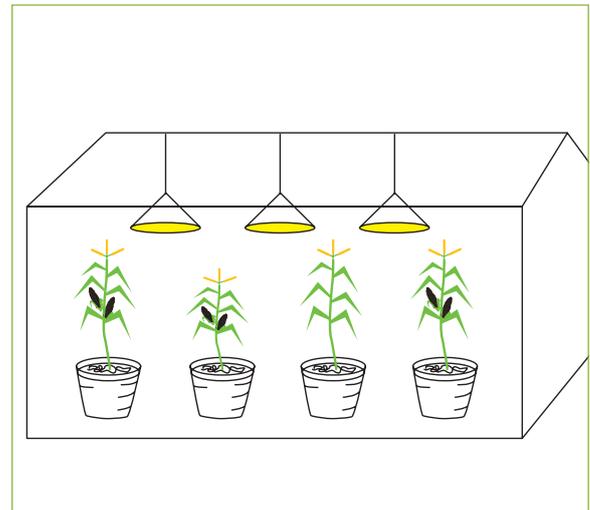
Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Test cross



Selezione fenotipica in condizioni controllate



Metodo:

Per incrociare delle varietà e/o selezionare degli ibridi, non basta selezionare i parentali puramente in base alla loro prestazione individuale; i parentali devono possedere anche una buona attitudine combinatoria, definita come la performance di una linea pura quando usata per produrre un ibrido. Per verificare questa attitudine, i parentali più promettenti vengono sottoposti a incroci di prova (test cross) e la performance della progenie viene valutata in campo nella stagione successiva. Queste valutazioni servono proprio a determinare l'attitudine combinatoria generale e specifica (vedi glossario) dei parentali.

Applicazione:

I test cross hanno un ruolo particolarmente importante nelle piante a impollinazione incrociata come il mais, la segale e molte foraggere, così come nel breeding di ibridi in generale.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Vedi le sezioni dedicate agli ibridi (pag. 18 e pag. 46).

Metodo:

Caratteri individuali controllati da un singolo gene (come la resistenza alla ruggine bruna nel frumento) possono essere valutati già in fase di plantula tanto in serra come in altri tipi di camere di crescita. Il vantaggio sperimentale è che le condizioni ambientali possono essere controllate e le prove diventano indipendenti dalla stagione esterna.

Invece, per caratteri quantitativi influenzati da più geni esiste una correlazione troppo debole tra il carattere osservato in condizioni controllate e quello osservato in una pianta adulta coltivata in pieno campo. In questo caso, le prove in condizioni controllate possono al massimo fornire una prima indicazione che dev'essere poi confermata in campo aperto.

Applicazione:

La selezione fenotipica in condizioni controllate si usa per selezionare caratteri a ereditarietà semplice (sotto il controllo di uno o pochi geni) e la cui espressione possa essere valutata già nelle prime fasi di crescita delle piante o su pochi individui. E' un tipo di selezione o preselezione che può essere portata avanti anche in una stagione diversa da quella di coltivazione della specie.

Oltretutto, nei casi in cui la valutazione della presenza di un carattere preveda l'inoculo di un patogeno, condizioni controllate ed isolate in serra o camera di crescita sono più sicure rispetto a rilasciare il patogeno in campo (la massima sicurezza si ottiene in serre appositamente isolate ed omologate per condizioni di quarantena).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

➤ In condizioni controllate non c'è selezione naturale né interazione con l'ambiente di coltivazione.

Selezione per la qualità tecnologica



Metodo:

Molti caratteri qualitativi o tecnologici (ad esempio la qualità panificatoria della granella di una varietà di frumento o la quantità di composti glucosinolati anti-cancerogeni del broccolo) non possono essere valutati guardando il fenotipo, ma solo tramite appositi test di laboratorio.

Applicazione:

Miglioramento mirato di caratteri qualitative che risponda a specifiche esigenze di mercato.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Selezione di caratteri organolettici



Metodo:

L'esame organolettico di un alimento derivato da una nuova varietà include la valutazione di aspetto, aroma e sapore in base alle preferenze dei consumatori. Queste valutazioni si eseguono tramite degustazioni cosiddette alla cieca (blind test) in base ad un disegno sperimentale.

Applicazione:

La selezione organolettica è usata frequentemente soprattutto su ortaggi, frutta ed erbe, permettendo di orientare la selezione in base alle preferenze dei consumatori.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Selezione tramite analisi di immagini**Metodo:**

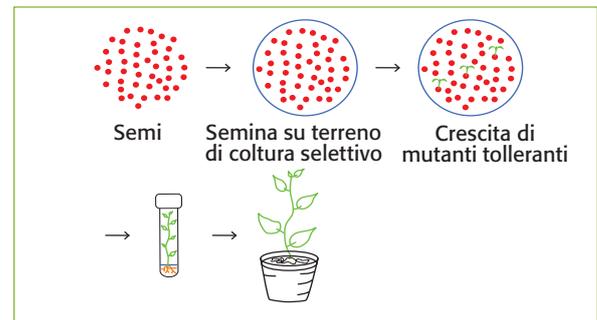
Ci sono diversi metodi di selezione basati sulla formazione ed interpretazione di immagini, tra i quali i più noti sono la cristallizzazione sensibile secondo Pfeiffer (cristallizzazione con cloruro di rame -CuCl), la cromatografia circolare (Chromatest) e la dinamolisi capillare secondo il metodo Wala. Il principio di base di tutti questi metodi è che quando esposto ad uno specifico trattamento, un tessuto vegetale, un campione di suolo o di un alimento, restituisce un'immagine o uno spettro di colori la cui forma ed armonia ne riflette il contenuto qualitativo e la vitalità. Queste vengono valutate confrontando le immagini ottenute con forme e immagini standard di riferimento.

Applicazione:

Sono metodi usati soprattutto nella coltivazione biodinamica per avere indicazioni sulle forze vitali dei suoi e dei cibi e per poterle aumentare. Possono anche essere usati per distinguere tra prodotti biologici e convenzionali.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Selezione *in vitro***Metodo:**

Con questo metodo, piante, singoli organi o protoplasti sono fatti crescere su un substrato artificiale di crescita. Per differenziamento da questi tessuti si ottengono nuove gemme e quindi nuove piante intere. Aggiustando la composizione del mezzo di crescita, le piante possono essere testate per diversi caratteri, come la tolleranza a stress biotici ed abiotici. Oltre che venire usate per selezionare per questi caratteri, sui tessuti cresciuti *in vitro* possono essere indotte nuove mutazioni, generando la cosiddetta variazione somaclonale che può essere poi trasferita alle piante che si ottengono per differenziazione cellulare. Per selezionare una resistenza ad un patogeno fungino, semi o embrioni cresciuti *in vitro* vengono esposti ad un mezzo di crescita che contiene il patogeno o la tossina che esso produce a danno della pianta. I semi che germinano saranno quelli portatori della resistenza a livello genetico. La selezione *in vitro* può essere usata per testare molti genotipi per un carattere specifico, rivelandosi un metodo di pre-selezione che può notevolmente ridurre il numero di genotipi da testare e selezionare in campo.

Applicazione:

La selezione *in vitro* è molto efficiente ed economicamente vantaggiosa per selezionare caratteri che possono essere rilevati già a livello cellulare, come la tolleranza a stress biotici ed abiotici introducibili nel mezzo di coltura (per esempio un alto contenuto di sale per la selezione di varietà tolleranti alla salinità). Si può cercare di ottenere una resistenza più o meno completa o parziale, variando l'intensità dello stress applicato nel mezzo di crescita.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- La selezione avviene in un ambiente artificiale e la coltivazione su un mezzo di crescita implica di norma l'aggiunta di fitormoni di sintesi.
- L'interazione della pianta con il terreno ed il clima non è possibile.

Selezione assistita da marcatori molecolari (marker assisted selection – MAS)

Metodo:

I marcatori molecolari sono specifiche regioni del DNA, ereditate secondo le leggi di Mendel, usate come strumento diagnostico per identificare differenze o somiglianze genetiche tra individui. Se per una determinata specie si dispone di marcatori molecolari distribuiti frequentemente sull'intero genoma si possono valutare con accuratezza relazioni di parentela tra individui e identificare potenziali parentali da incrocio. I marcatori si possono usare anche per selezionare caratteri desiderati ma in questo caso si deve prima effettuare la cosiddetta analisi di associazione (linkage analysis) per identificare quali marcatori sono associati ai caratteri fenotipici desiderati.

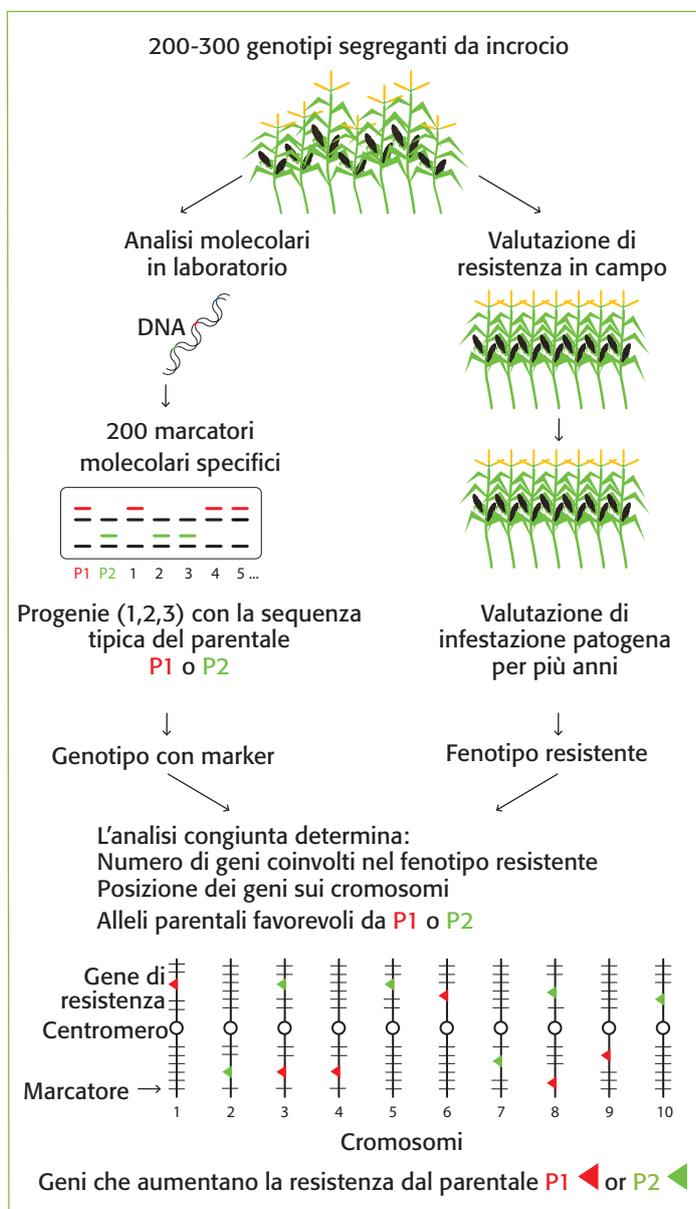
Per un carattere monogenico, due marcatori affiancati al gene di interesse sono sufficienti ad indicare la sua presenza e quindi la presenza del carattere desiderato a livello fenotipico. D'altra parte, per un carattere a controllo poligenico, è necessario conoscere due marcatori adiacenti ad ognuno dei geni coinvolti nel controllo del carattere. In pratica, la selezione assistita da marcatori (MAS) prevede l'estrazione di DNA dal tessuto fogliare della progenie di un incrocio, ed il suo sequenziamento. Le piante che possiedono il pattern associato al carattere desiderato vengono portate avanti nel processo di selezione. I marcatori sono usati esclusivamente a livello diagnostico e non cambiano il DNA delle piante a cui sono applicati.

Applicazione:

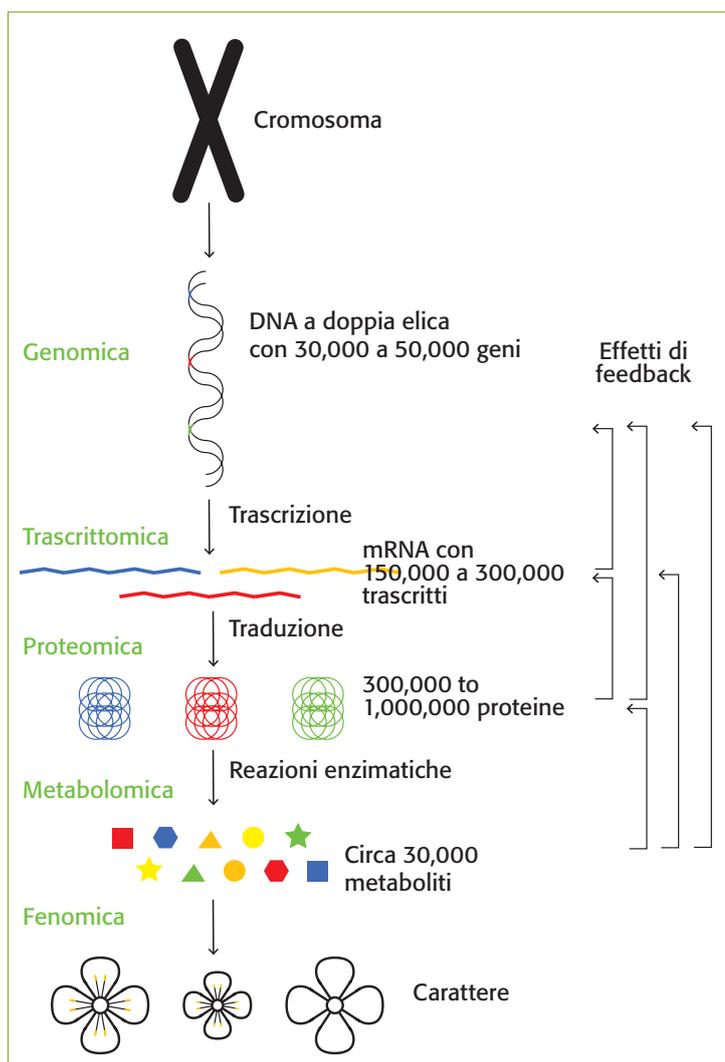
L'analisi tramite marcatori molecolari è una procedura diagnostica che permette l'identificazione di caratteri mono- e poli-genici a livello del DNA, indipendentemente dall'ambiente in cui le piante crescono. È stata usata con successo per trasferire geni specifici, così come per identificare caratteri complessi (poligenici) oppure più geni di resistenza difficili da distinguere a livello fenotipico. I marcatori permettono inoltre di analizzare la diversità genetica di una coltura o di certi agenti patogeni delle piante in modo molto accurato, fornendo informazioni importanti per selezionare parentali di incrocio, identificare un set di germoplasma da conservare in modo prioritario, caratterizzare popolazioni di patogeni e sviluppare strategie per evitare il superamento di meccanismi di resistenza.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Nello sviluppo e l'applicazione di marcatori molecolari, si usano degli enzimi che sono di solito prodotti da batteri geneticamente modificati.
- Le piante sono valutate puramente in base alla loro sequenza di DNA. Le interazioni genotipo-ambiente e gli effetti epigenetici non sono tenuti in conto.



Proteomica/Metabolomica



Metodo:

La proteomica studia il proteoma, ovvero l'insieme di tutte le proteine note in una cellula o una pianta in un certo stadio di crescita e coltivata in determinate condizioni. Al contrario della sequenza di DNA, che è identica in tutte le cellule in ogni momento, la qualità e quantità di proteine e la loro composizione può cambiare in funzione delle condizioni ambientali e dello stadio di crescita della pianta.

In modo simile, la metabolomica (o profilo metabolico) è un'analisi quantitativa di vari prodotti metabolici, i metaboliti. Mentre l'analisi tramite marcatori di DNA si usa per segnalare la presenza di un gene responsabile di un certo carattere, la proteomica permette di determinare quali geni sono effettivamente espressi. Lo studio proteomico e metabolomico di un'ampia gamma di genotipi può dare informazioni importanti sulle proteine ed i metaboliti coinvolti nell'espressione di un certo carattere (ad esempio la tolleranza ad alte temperature). Se la funzione di singole proteine o metaboliti è nota, la selezione può essere portata avanti direttamente a questo livello, senza indagare direttamente a livello genetico.

Applicazione:

La selezione in base ai metaboliti è attualmente usata soprattutto in piante da frutto, ortaggi e piante medicinali per migliorarne le qualità organolettica, nutrizionale e tecnologica. Tali nuove tecnologie permettono una sistematica ed accurata analisi delle strutture vegetali, le funzioni e le interazioni con l'ambiente. I risultati ottenuti da piante modello indicano che l'espressione di caratteri complessi può essere prevista in base ad analisi molecolari e biochimiche di numerosi caratteri proteomici e metabolomici. Ad oggi, si continuano a testare queste tecniche a livello di ricerca, per meglio comprendere la risposta delle piante a stimoli ambientali e sviluppare strategie di selezione appropriate.

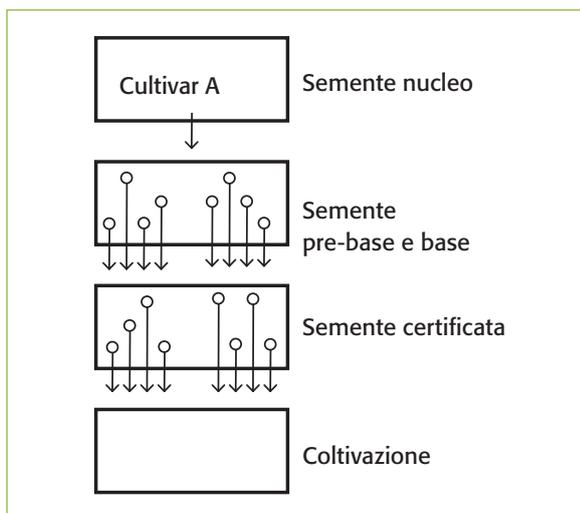
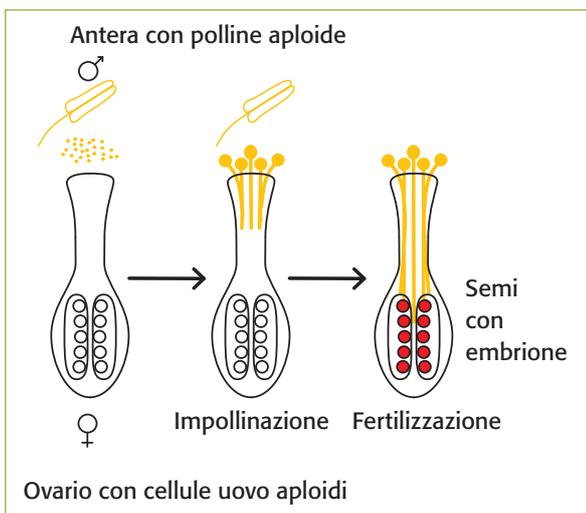
Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- E' un metodo altamente tecnologico. Le funzioni della pianta e le sue interazioni con l'ambiente sono considerate in isolamento, in un approccio decisamente riduzionista.

3. Propagazione

a: Tecniche a livello di pianta intera

Propagazione sessuale o generativa



Metodo:

Quando le piante o le popolazioni sono propagate per seme, si parla di propagazione sessuale. Grazie alla fusione tra una cellula uovo ed il polline, la progenie riceve un corredo cromosomico dalla pianta madre ed uno dalla pianta padre. Quando la riproduzione sessuale avviene tra due linee pure omozigoti identiche, la progenie F1 è geneticamente uguale ai genitori in quanto la cellula uovo ed il polline hanno lo stesso corredo cromosomico. In piante omozigoti ma non identiche ed in quelle eterozigoti, durante la meiosi e la successiva fertilizzazione, i geni parentali subiscono una ricombinazione che fa sì che la progenie sia portatrice di una serie di caratteristiche differenti da quelle dei genitori. Dal momento che la cellula del polline consiste in larga misura di nucleo, gli organuli ed il loro DNA extra-cromosomico vengono ereditati dalla cellula uovo, cioè sono a eredità materna.

Questa propagazione, la più naturale per un gran numero di specie vegetali coltivate e non, può avvenire in campo, in serra o in camera di crescita. E' tramite propagazione sessuale che vengono moltiplicate le sementi di una varietà durante le varie fasi che portano dalla selezione (alla fine della quale si ha poca semente nucleo) fino alla commercializzazione di semente certificata.

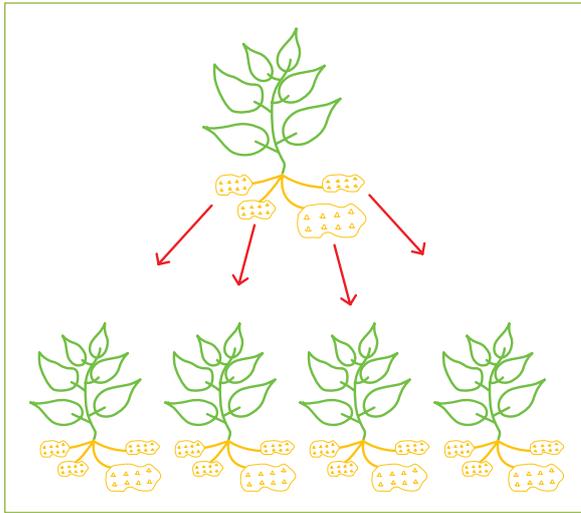
Applicazione:

La maggior parte delle cultivar di piante alimentari sono propagate per seme.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Propagazione vegetativa



Metodo:

Nella propagazione vegetativa (o asessuale), invece che per seme le piante sono riprodotte tramite talee, divisioni, stoloni, bulbi, tuberi, ecc. Questi metodi sfruttano la capacità di una pianta intera di rigenerarsi da un singolo organo o una singola cellula. Il corredo cromosomico resta invariato, anche se gli organuli possono segregare. La propagazione vegetativa viene usata per aumentare le piante eterozigoti in una maniera geneticamente stabile (senza ricombinazione), anche se questo obiettivo può essere raggiunto anche con l'apomissia (vedi sezioni successiva) e la selezione di ibridi.

La propagazione vegetativa può avvenire in campo (come per la patata), in serra o in camera fredda. Le tecniche variano a seconda della specie. Per esempio nei fruttiferi, l'innesto di marze o gemme su portinnesti è molto frequente, come anche l'uso di ormoni radicali per promuovere il radicamento delle talee. Pesticidi di sintesi sono spesso usati in combinazione con queste tecniche per evitare attacchi batterici o fungini sui propaguli vegetativi. Uno svantaggio è che il materiale vegetativo ha una durata ed una conservabilità molto inferiori a quelle del seme.

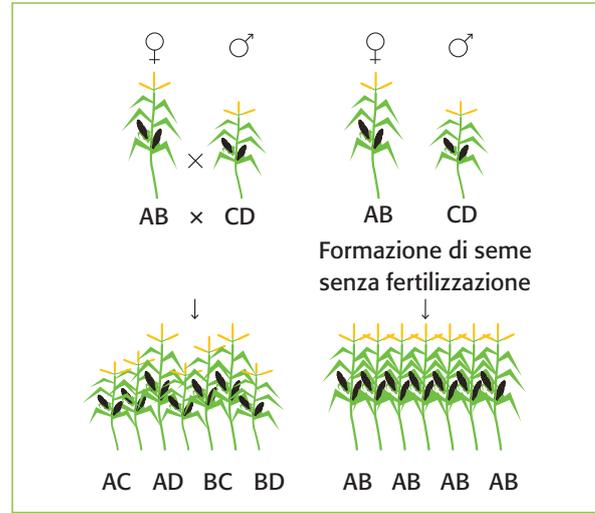
Applicazione:

La propagazione vegetativa è usata in patata, melo, vite e molte piante ornamentali. Talvolta vengono propagati vegetativamente anche i parentali di varietà ibride o derivati da incroci multipli (polycross varieties).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- L'applicazione di ormoni e pesticidi di sintesi.

Apomissia



Metodo:

Certe piante possono riprodursi asessualmente tramite seme, grazie ad un fenomeno chiamato apomissia. Durante la formazione del seme, la meiosi (essenziale per la riproduzione sessuale) viene soppressa facendo sì che l'embrione risulti geneticamente identico alla pianta madre. Per alcune piante, l'unico modo per produrre seme è tramite apomissia ed i loro semi contengono quindi solo embrioni apomittici. D'altro canto, ci sono anche piante apomittiche facoltative, che possono formare sia semi da riproduzione sessuale che da apomissia. Nonostante l'apomissia sia una riproduzione asessuata, l'impollinazione è di solito necessaria per avviare il processo di formazione del seme. Molte piante apomittiche sono poliploidi.

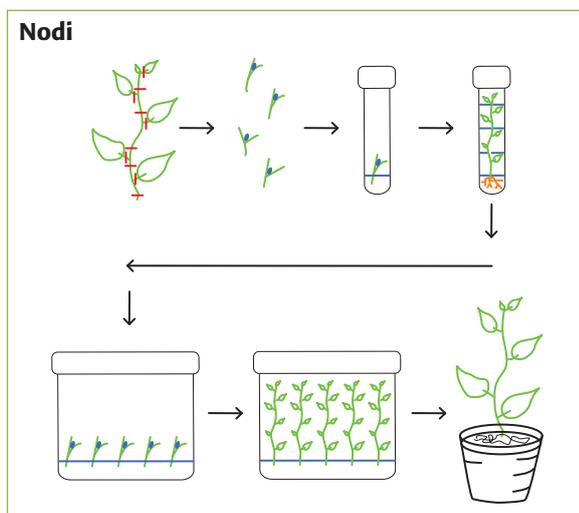
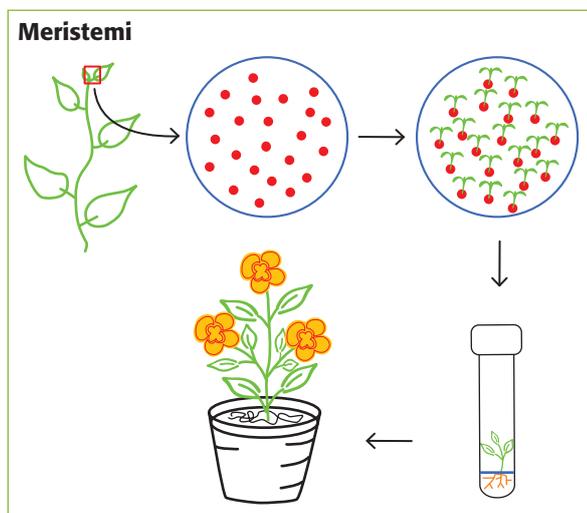
Applicazione:

L'apomissia avviene naturalmente in alcune specie coltivate (per esempio in *Poa pratensis*) e selvatiche (tarassaco) ed è interessante per il selezionatore perché combina i vantaggi della propagazione per seme, come la praticità e la maggior sicurezza fitosanitaria, con quelli della propagazione vegetativa, *in primis* il mantenimento del genotipo materno. E' considerata anche un metodo promettente per moltiplicare varietà eterozigoti e preservare l'eterosi negli ibridi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Piante apomittiche non hanno molta utilità nel prosieguo del miglioramento genetico, in quanto la progenie è identica al parentale.

Propagazione *in vitro* di meristemi, nodi o calli



Metodo:

Per la propagazione *in vitro*, parti di pianta, tessuto o cellule singole vengono cresciute su un mezzo di crescita sterile e riprodotte vegetativamente. A seconda della specie vegetale, vengono usate a questo scopo parti diverse della pianta, tra cui porzioni di stelo con una gemma ascellare, porzioni di foglia o di bulbo. Queste parti diventano dei germogli che possono essere ulteriormente propagati. Il processo viene ripetuto fino a che non si hanno abbastanza piante. Quando si formano le radici, le piante vengono trasferite e ripiantate in serra o in campo.

Quando si usano metodi *in vitro* per la propagazione vegetativa via meristema (estremità di germoglio), il processo è noto come cultura di meristemi. Questa consiste nella coltivazione di cellule indifferenziate capaci di dividersi; grazie alla velocità delle divisione cellulare, il materiale che ne deriva è spesso libero da malattie e virosi. Pertanto, la coltura di meristemi è spesso usata per produrre materiale vegetale sano.

Anche tessuti fogliari, cime fiorali e nodi possono essere coltivati su un mezzo di crescita. Le cellule di ogni tessuto sono prima de-differenziate e poi stimolate a dividersi; ciò produce un cosiddetto "callo" (ammasso di cellule indifferenziate), che può essere stimolato a formare germogli e radici, o embrioni somatici che poi germineranno. Le nuove plantule possono essere indotte a formare numerosi germogli accessori, risultando in alti tassi di propagazione.

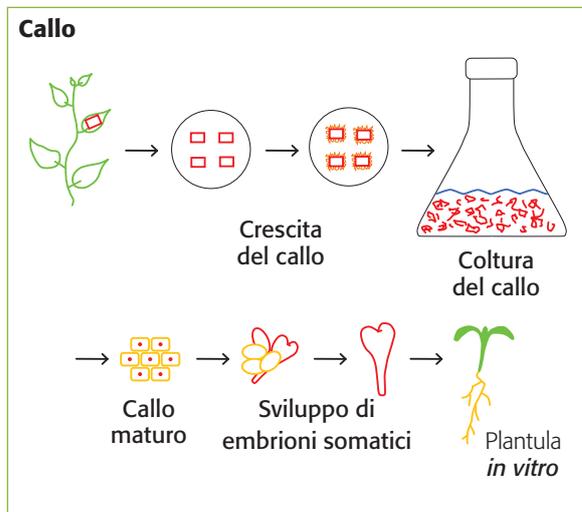
In casi estremi, si può ottenere la rigenerazione di una pianta intera da una singola cellula. Per esempio, digerendo enzimaticamente un tessuto fogliare, si dissolve la parete cellulare e i risultanti protoplasti (cellule senza una parete) vengono rilasciati. Questi possono essere cresciuti in un mezzo liquido, per rigenerare una pianta intera.

Applicazione:

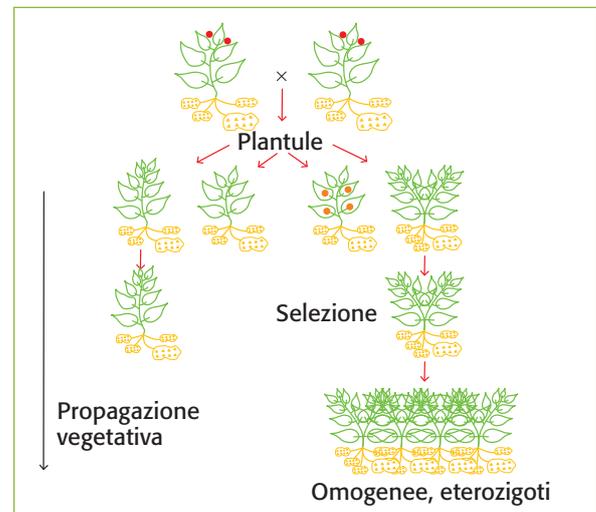
La propagazione *in vitro* viene usata per riprodurre materiale vegetale privo di virus (per esempio in patata) e per propagare rapidamente cloni e parentali per la creazione di ibridi. Il metodo permette di moltiplicare piante geneticamente identiche in pochissimo tempo. In un anno, più di un milione di individui identici possono essere prodotti a partire da una singola pianta. Il mezzo di crescita sterile frena la diffusione di malattie. E' inoltre un metodo molto efficiente dal punto di vista dello spazio occupato e della possibilità di automazione. E' possibile conservare colture *in vitro* a basse temperature per lunghi periodi di tempo, strategia che viene usata anche per la conservazione delle risorse genetiche (crio-conservazione).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- › La coltivazione di questi tessuti o cellule viene effettuata su mezzi di crescita artificiali in cui di solito si aggiungono fitormoni di sintesi.



Varietà clonali



Descrizione:

Le specie a propagazione vegetativa trasmettono invariata la loro composizione genetica alla progenie. Nel miglioramento di tali specie si ottengono di solito varietà clonali. Il processo della selezione clonale si sviluppa lungo tre fasi:

- i. Creazione di variabilità genetica tramite riproduzione sessuale.
- ii. Selezione della progenie.
- iii. Propagazione vegetativa delle piante migliori e successiva registrazione della varietà.

Le varietà clonali sono generalmente altamente eterozigoti e omogenee proprio per il fatto di essere state ottenute vegetativamente. Grande attenzione va dedicata agli aspetti fitosanitari (infezioni batteriche, fungine o virali). Quando una varietà clonale si propaga per seme, si osserva una ampia segregazione fenotipica.

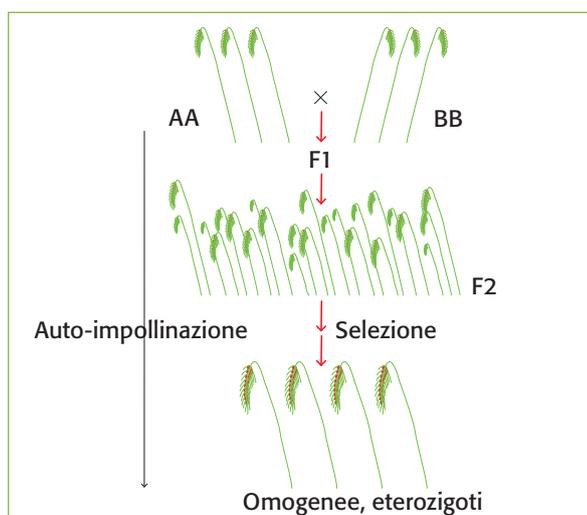
Applicazione:

Varietà clonali possono essere selezionate in meno di cinque anni in quanto la selezione può già avvenire nella prima generazione filiale (F1). Fenotipi interessanti, soprattutto quelli che manifestano la massima eterosi grazie ad una grande divergenza tra parentali, possono essere mantenuti e propagati fin da subito vegetativamente. Varietà clonali sono molto comuni nelle specie perenni ed in quelle con un'alta tendenza alla riproduzione vegetativa (e.g. patata, fruttiferi, vite, molte ornamentali).

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Linee pure



Descrizione:

Le linee pure vengono di solito sviluppate in specie autogame. Il processo comprende i seguenti passaggi:

- i. Creazione di variabilità genetica tramite incrocio tra due parentali scelti.
- ii. Propagazione della progenie F1 (omogenea) tramite auto-impollinazione.
- iii. Selezione massale nelle generazioni F2 a F4 (disomogenee).
- iv. Selezione di piante singole tra la generazione F5 e F8.
- v. Propagazione sessuale delle migliori linee pure ottenute e successiva registrazione varietale.

Le linee pure sono altamente omozigoti ed omogenee. La progenie di una linea pura è anch'essa geneticamente identica ai genitori e può essere facilmente riprodotta.

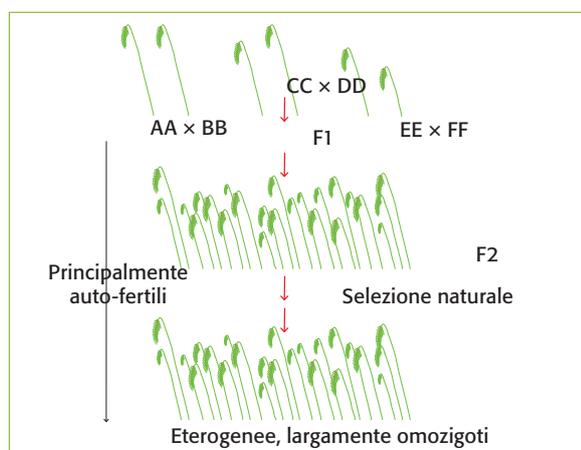
Applicazione:

Incroci controllati tra linee pure forzano l'impollinazione incrociata in piante naturalmente autogame. In questo modo, i geni parentali vengono ricombinati creando un'alta diversità genetica che può essere usata per selezionare nuove varietà. È un procedimento comune nel miglioramento genetico di specie autogame importanti come il frumento, l'orzo, il pisello o la soia.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Le linee pure sono geneticamente molto simili e pertanto più suscettibili a malattie e attacchi biotici.

Popolazioni di incroci o "evolutive"



Descrizione:

Le popolazioni di incroci, dette anche evolutive o CCP (dall'inglese composite cross populations) vengono anch'esse create allo scopo di ottenere una maggior diversità genetica in specie autogame. Il loro sviluppo prevede:

- i. Molti incroci tra varietà elette.
- ii. Propagazione dell'intera progenie nell'ambiente target.

La propagazione si effettua per varie generazioni nel luogo in cui si intende coltivare la varietà definitiva. Questo assicura che i genotipi meglio adattati presenti nella popolazione si affermeranno in maggior numero e più velocemente grazie alla selezione naturale.

Inoltre, con questo metodo si ottengono maggiori tassi di eterozigosi e diversità allelica rispetto all'uso delle linee pure o dei miscugli varietali.

Applicazione:

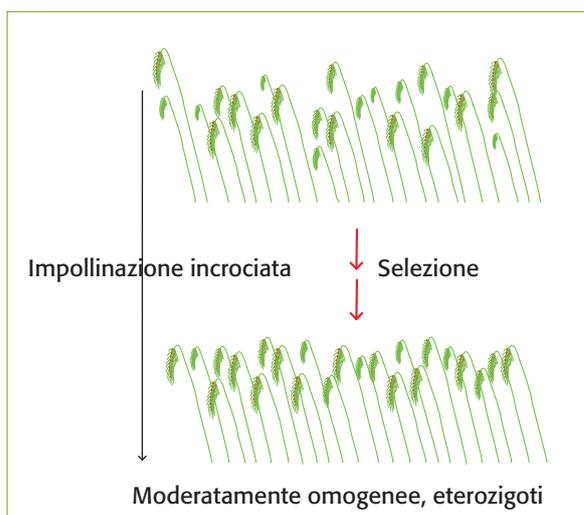
L'uso delle popolazioni evolutive stimola la selezione e l'adattamento locale delle piante all'ambiente. Queste popolazioni sono più eterozigoti ed eterogenee che le linee pure e rispondono quindi in modo migliore a fluttuazioni ambientali. Le sperimentazioni di più lunga data con questi materiali in Italia riguardano i frumenti, ma si stanno rapidamente estendendo ad altri cereali (avena, mais e miglio), ortaggi (zucchina e pomodoro) e legumi (lenticchia).

Oltre a partecipare attivamente in partenariato con altre istituzioni nazionali a queste sperimentazioni, RSR ha aderito alla fase sperimentale lanciata dalla Commissione Europea sulla commercializzazione di seme da popolazioni evolutive (decisione 2014/150/EU). In questo contesto, RSR fornisce appoggio tecnico e legale agli agricoltori coinvolti ed interagisce con le istituzioni nazionali incaricate del controllo ed il registro delle sementi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Varietà a impollinazione aperta



Descrizione:

Le varietà a impollinazione aperta vengono tradizionalmente sviluppate da piante allogame e la popolazione iniziale migliorata tramite selezione massale. Oltre alla selezione massale semplice, si possono usare anche gli incroci reciproci tra individui migliori e la selezione ricorrente per migliorare ulteriormente la popolazione. Il mantenimento di una varietà ad impollinazione aperta di una specie allogama è tuttavia abbastanza laborioso; queste varietà devono infatti essere cresciute ad una certa distanza tra loro per evitare che si contaminino e perdano le loro caratteristiche distintive, incrociandosi.

Le varietà a impollinazione aperta possiedono una eterozigosi media o alta e sono moderatamente omogenee.

Applicazione:

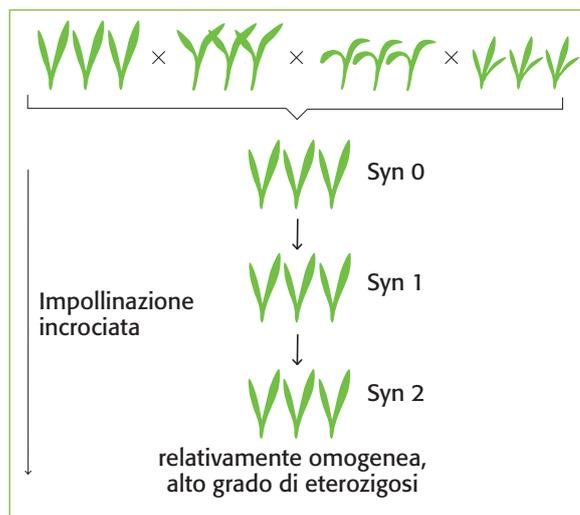
Varietà ad impollinazione aperta sono di solito usate nelle specie a impollinazione incrociata (per esempio in mais e segale). Geneticamente sono moderatamente eterogenee ed eterozigoti.

Grazie alla loro maggiore variabilità genetica, sono in genere capaci di un miglior adattamento a nuovi ambienti rispetto alle linee pure o agli ibridi.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Varietà derivate da incroci multipli



Descrizione:

L'obiettivo delle varietà da incroci multipli (polycross varieties in inglese) è quello di migliorare l'omogeneità di una varietà ad impollinazione aperta, senza perderne l'alto valore di eterozigosi. Un numero limitato di parentali (4 a 20) vengono incrociati in modo controllato o semplicemente messi a crescere insieme. La progenie, detta anche varietà o popolazione sintetica (Syn), possiede un alto grado di eterozigosi ma è anche più omogenea di una popolazione evolutiva. Tale progenie (Syn 0) può essere poi propagata tramite impollinazione aperta per diverse generazioni (Syn 1, 2, e così via); ad un certo punto però, la progenie dev'essere ricreata a partire dai componenti parentali. E' importante che i parentali siano prima testati per la loro attitudine combinatoria. Le varietà polycross sono uno stadio intermedio tra le varietà ad impollinazione aperta e gli ibridi, i quali devono essere ricreati ogni volta *ex novo* dai parentali originali per mantenere il loro massimo potenziale di resa.

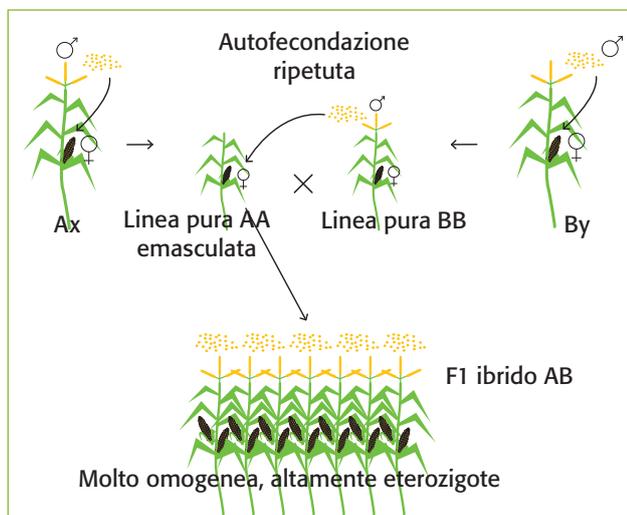
Applicazione:

Varietà polycross sono comuni nel breeding di specie foraggere e di specie a parziale impollinazione incrociata. (per esempio la fava). Sono eterozigoti ma più omogenee che le varietà a impollinazione aperta. A differenza degli ibridi, l'agricoltore può riseminare la semente dell'anno precedente per diverse generazioni senza un sostanziale calo nelle prestazioni.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

Nessuna

Ibridi



Descrizione:

Il miglioramento genetico tramite ibridi si fonda sullo sfruttamento del cosiddetto effetto di eterosi. Eterosi è il termine usato per descrivere la superiorità di un incrocio ibrido rispetto ai suoi parentali. Il vantaggio degli ibridi è un effetto positivo sulle prestazioni di una pianta dovuto alla sua alta eterozigosi ad un gran numero di *loci* genetici. Quest'effetto può essere sfruttato tanto più pienamente quanto più sono distanti geneticamente le linee parentali che vengono incrociate: gli ibridi risultanti (la generazione F1) hanno eterosi massima e sono anche molto omogenei. Lo svantaggio, d'altro canto, è che la generazione successiva (F2) è estremamente variabile a causa della segregazione dei caratteri, e pertanto solo una parte di questa progenie rispecchia le stesse prestazioni e caratteristiche della generazione precedente. Ciò implica che per mantenere le prestazioni dell'ibrido originale, il seme dev'essere ri-ottenuto a partire dai parentali ad ogni generazione.

Per produrre un ibrido a costi ragionevoli, la linea materna dev'essere maschio sterile o venire emasculata manualmente. La tecnica usata più comunemente è quella della maschio-sterilità citoplasmatica. La linea materna viene incorporata nel citoplasma della pianta maschio sterile grazie a una serie ripetuta di retro-incroci (vedi sezione pag. 22), risultando in due linee quasi identiche: la linea materna nel citoplasma maschio sterile e la linea materna fertile nel citoplasma normale. La linea fertile è necessaria per il mantenimento e la propagazione della linea sterile (tramite incrocio) e si chiama pertanto linea mantentrica (*maintainer line*). Per produrre un ibrido fertile (fondamentale se la specie in questione è usata per la produzione di seme), il citoplasma della pianta materna dev'essere reso nuovamente maschio-fertile ed a questo scopo vengono scelte per l'incrocio linee paterne portatrici di geni restauratori della fertilità.

Applicazione:

L'uso di ibridi è pratica comune in specie allogame come mais, segale, colza, girasole, carota e cavolo; sono in crescita anche gli usi in piante autogame come il cotone e frumento grazie alla loro alta omogeneità e buone prestazioni.

Prospettive critiche dal punto di vista dell'agricoltura biologica:

- Gli ibridi non possono essere riprodotti per seme dall'agricoltore senza incorrere in un calo delle prestazioni. Questo limita l'autonomia di chi li coltiva e aumenta la dipendenza dalle ditte sementiere.
- Gli ibridi derivati da linee materne maschio-sterili non possono essere usate in ulteriori programmi di breeding, per ottenere nuove varietà fertili a meno che non vengano impiegati geni restauratori per ristabilire la fertilità (per esempio in broccolo e cavolfiore).

Criteria per la valutazione delle tecniche di miglioramento genetico

Il 2 di Marzo 2011, trenta esperti provenienti da compagnie sementiere, enti di ricerca, organizzazioni di produttori e il Consorzio Europeo per il Miglioramento Genetico Ecologico ECO-PB si sono riuniti in un seminario a Francoforte per redigere una lista di criteri con i quali valutare le diverse tecniche di selezione nel contesto dell'agricoltura biologica.

Questo incontro si è concluso con un largo consenso sul fatto che nella selezione di varietà da usare in agricoltura biologica non solo l'integrità del genoma ma anche quella della cellula- la più piccola unità del vivente da cui può essere generata una pianta - dev'essere rispettata. La considerazione della cellula come unità inscindibile implica rispettare le interazioni funzionali tra i suoi componenti, come il DNA cromosomico ed extra-cromosomico, gli organuli, il citoplasma, la membrana cellulare ed i meccanismi regolatori associati. Tali meccanismi (che sono il campo dell'epigenetica) fanno sì che cellule indifferenziate portatrici

di dello stesso genoma possano svilupparsi in modi diversi, diventando cellule fiorali, fogliari o radicali. Secondo l'agricoltura biologica, pertanto, la cellula deve essere protetta da qualsiasi intervento tecnologico e fisico.

Il risultato formale del suddetto seminario è stato un documento programmatico sul miglioramento genetico per l'agricoltura biologica, avallato da esperti ed attori del settore del biologico. L'esistenza di un documento formale dà autorevolezza a programmi di miglioramento dedicati specificamente al biologico, così come una maggiore sicurezza, trasparenza ed un comune terreno d'azione a selezionatori e agricoltori, servendo anche come base per le organizzazioni del bio che vogliono redigere delle linee guida vincolanti per propri associati; inoltre, contribuisce a sensibilizzare il pubblico più ampio sull'importanza delle sementi e del miglioramento genetico nell'ambito della produzione alimentare sostenibile.

Documento programmatico sul miglioramento genetico per l'agricoltura biologica

(Redatto in base alle discussioni tenutesi nel seminario di esperti del 2 Marzo 2011 a Francoforte ed approvato dall'Assemblea Generale di ECO-PB il 6 Novembre 2012)

Il miglioramento genetico per l'agricoltura biologica è parte integrante della pratica bio. Secondo IFOAM (Federazione Internazionale dei Movimenti di Agricoltura Biologica), chi lavora nel settore si impegna a preservare e migliorare la fertilità del suolo, promuove la diversità genetica di piante, animali e gli altri organismi dell'agroecosistema, conserva le risorse naturali e contribuisce a raggiungere e mantenere un equilibrio ecologico stabile. Inoltre si assume la responsabilità sociale del proprio lavoro e si batte per giustizia ed equità.

Le piante coltivate sono la base del nostro cibo. Per migliaia di anni, il miglioramento genetico è stato intrinsecamente legato alla nostra cultura. E' pertanto di vitale importanza per il nostro futuro che gli agricoltori abbiano accesso a sementi e materiale di riproduzione di un'ampia gamma di specie e varietà adattate ai diversi ambienti di coltivazione. Dovrebbe essere permesso (ed anzi, incoraggiato!) che gli agricoltori continuino a migliorare le varietà che usano coltivandole e selezionandole nel proprio micro-ambiente. La diversità genetica tra specie ed all'interno della stessa specie permette alle piante di adattarsi conti-

nuamente alle fluttuazioni ambientali, e permette all'uomo di continuare a fare miglioramento sfruttando tale diversità ed adattabilità. La dignità delle creature viventi dev'essere tenuta in conto: come tutti gli organismi viventi, anche le piante hanno un valore intrinseco indipendentemente dagli interessi dell'uomo. Il miglioramento genetico nel biologico promuove la diversità genetica e tiene conto dell'abilità e utilità della riproduzione naturale. Rispetta anche l'integrità genetica della pianta, le naturali barriere di incrocio ed i meccanismi di regolazione e si impegna a salvaguardare la fertilità, l'autonomia e l'adattamento evolutivo delle piante coltivate. Questo significa che quando vengono scelte delle varietà per l'agricoltura biologica, si considera non solo la loro convenienza per la coltivazione ma anche la loro origine in termini di percorso di selezione. Vista la moltitudine di metodi di miglioramento genetico e di tecniche ad oggi utilizzate per sviluppare nuove varietà, questa valutazione non è semplice. In questo contesto, i criteri che seguono intendono servire come riferimento per una valutazione trasparente dei diversi approcci al miglioramento genetico e la loro coerenza con i principi del biologico.

Obiettivi del miglioramento genetico per l'agricoltura biologica

1. Gli obiettivi del miglioramento genetico corrispondono alle necessità dell'intera filiera biologica (agricoltori, trasformatori, commercianti e consumatori). Mirano inoltre all'uso sostenibile delle risorse naturali ed allo stesso tempo tengono in conto l'equilibrio dinamico dell'intero agro-ecosistema.
2. Il miglioramento genetico contribuisce alla sicurezza e sovranità alimentari, alla produzione sostenibile e stabile di prodotti vegetali (cibo, fibre, medicine, legname) ed al benessere collettivo mirando alla soddisfazione di
3. Il miglioramento genetico conserva e valorizza la diversità genetica delle colture, promuovendo così l'agrobiodiversità.
4. Il miglioramento genetico contribuisce in modo importante allo sviluppo delle specie coltivate ed al loro adattamento a condizioni future (per esempio al cambio climatico).

Criteria etici

1. Il genoma viene rispettato come entità indivisibile e ci si astiene da invasioni tecniche/fisiche alla sua integrità (e.g. tramite trasferimenti di DNA, RNA o proteine, mutagenesi artificiale).
2. La cellula viene rispettata come entità funzionale indivisibile e ci si astiene da intrusioni tecniche/fisiche (e.g. digestione della parete cellulare, distruzione del nucleo tramite fusione citoplastica).
3. La capacità di una varietà di riprodursi in maniera specie-specifica deve essere mantenuta e si esclude l'uso di qualsiasi tecnologia che riduce la capacità riproduttiva/germinativa di specie propagate per seme.
4. Una varietà deve potersi impiegare in ulteriori programmi di miglioramento genetico e propagazione della semente. Questo significa che anche sotto un regime di protezione UPOV, l'eccezione del selezionatore ed il privilegio dell'agricoltore devono essere legalmente garantiti, che ci si astiene dal brevettare le varietà vegetali e dal restringere la capacità di incrocio per vie tecnologiche (per esempio usando la maschio-sterilità senza geni restauratori).
5. La creazione di diversità genetica avviene all'interno delle naturali barriere di incrocio-interspecifico via fusione di polline e cellula uovo. L'ibridazione forzata di cellule somatiche (per esempio tramite fusione cellulare) è evitata.
6. In alternativa agli ibridi ormai largamente usati commercialmente, si privilegia la selezione di varietà non ibride per dare agli agricoltori la possibilità di riprodurre la semente.
7. I principi dell'agricoltura biologica (salute, ecologia, giustizia) fanno da guida per le attività di miglioramento genetico.

Criteria specifici alle strategie di selezione

1. L'ambiente nel quale avviene la selezione è tale da permettere di tenere conto delle interazioni pianta/ambiente, accelerare la selezione e beneficiare di eventuali effetti epigenetici. In altre parole, è importante che la selezione avvenga in condizioni di agricoltura biologica o basso input.
2. La selezione fenotipica in campo può essere affiancata da ulteriori metodi di selezione (ad esempio analisi di metaboliti o marcatori molecolari a scopo diagnostico).
3. I selezionatori che operano nel settore bio svilupperanno varietà biologiche solo a partire da materiale che non sia stato contaminato da prodotti di ingegneria genetica.

Criteria socio-economici

1. Si incoraggia lo scambio di risorse genetiche mentre si esclude qualsiasi forma di brevetto su organismi viventi, i loro metaboliti o sequenze geniche, o su metodi di selezione.
2. Il processo di selezione, il materiale di partenza (come i parentali di un incrocio o le popolazioni iniziali) e le tecniche applicate saranno rese pubbliche in modo da permettere a produttori e consumatori di scegliere le varietà in base alle loro esigenze, priorità e valori (per esempio l'uso di varietà da mutagenesi verrà dichiarata espressamente).
3. Si incoraggiano e promuovono programmi di miglioramento che coinvolgano tutti gli attori della filiera (produttori, trasformatori, commercianti e consumatori).
4. Si aspira ad una pluralità di programmi di miglioramento indipendenti e dedicati a diversi tipi di colture in modo da aumentare la biodiversità agricola.

Scelta delle varietà in agricoltura biologica

Ad oggi, tutte le varietà il cui seme o materiale vegetativo sia stato propagato in condizioni di agricoltura biologica sono ammesse nel bio, a meno che non siano dichiaratamente organismi geneticamente modificati (Regolamento Comunitario (EC) 834/2007 del 28 Giugno 2007 sulla produzione biologica e l'etichettatura dei prodotti biologici). Solo nel caso in cui non esistano sul mercato varietà biologiche appropriate, una deroga a detto regolamento permette l'uso di varietà propagate non in regime biologico purchè il materiale di semina non sia trattato chimicamente. Riassumendo, nel bio troviamo le seguenti categorie di varietà:

- i. Varietà derivate da miglioramento genetico convenzionale adatte all'agricoltura biologica, ad eccezione di varietà geneticamente modificate, propagate in regime biologico oppure convenzionale ma non trattate;
- ii. Varietà derivate da programmi di miglioramento non interamente condotti in bio ma che pongono con un'enfasi specifica su obiettivi di selezione o ambienti di coltivazione biologici e propagano il seme in regime biologico (breeding per il bio.);
- iii. Varietà derivate da programmi di miglioramento specificamente dedicati al biologico o addirittura condotti on farm (in aziende agricole bio), selezionate quindi in regime biologico tenendo conto dei criteri citati sopra.

Le varietà selezionate usando tecniche che violano l'integrità del genoma (e.g piante transgeniche) o della cellula (come le fusione dei citoplasti) devono essere escluse dall'uso in agricoltura biologica. Per essere ammesse nel bio sotto le categorie varietali I e II, i criteri di cui sopra (soprattutto quelli 1-5) dovranno essere attentamente valutati.

Varietà disponibili ad oggi per l'agricoltura biologica sono soprattutto derivate da programmi di miglioramento convenzionali. Questa tendenza dovrebbe essere urgentemente cambiata, soprattutto per colture come cotone, soia, mais dove prevalgono varietà derivate da ingegneria genetica, o come broccolo e cavolfiore in cui il miglioramento è quasi esclusivamente centrato sull'uso di ibridi maschio-sterili. In queste specie, la scelta varietale per il bio è estremamente scarsa. Più in generale, la forte monopolizzazione del mercato, la concentrazione della selezione su poche specie, la prevalenza di sementi propagate in regime convenzionale, rendono molto ristretta la gamma varietale disponibile ad un agricoltore biologico. Le sementi ed il materiale vegetativo sono tra le nostre risorse più importanti. E' pertanto essenziale che le varietà delle categorie i e iii vengano attivamente promosse.

Bibliografia e letture

- Borgen A. (2009).** Present and future system organisation of organic plant breeding. In: 1st IFOAM Int. Conference on Organic Animal and Plant Breeding. Ed. A Zschoke. pp 253–255. IFOAM, Santa Fe, New Mexico, USA.
- Ceccarelli, (2015).** "Efficiency of plant breeding." *Crop Science* 55: 87–97.
- Ceccarelli, S. (2011).** Biodiversità, miglioramento genetico partecipativo e diritto al cibo. (Chi decide cosa mangerai stasera per cena?). *Agricoltura Istituzioni Mercati*: 77–90.
- Ceccarelli, (2009).** "Evolution, plant breeding and biodiversity." *Journal of Agriculture and Environment for International Development (JAEID)* 103. 1/2 (2009): 131–145.
- Halewood M., Chiurugwi T., Sackville Hamilton R., Kurtz B., Marden E., Welch E., Michiels F., Mozafari J., Sabran M., Patron N., Kersey P., Bastow R., Dorius S., Dias S., McCouch S., Powell W.** Plant genetic resources for food and agriculture: opportunities and challenges emerging from the science and information technology revolution. *New Phytologist* 217 (2018): 1407–1419.
- Harl, N.E. (2000).** The age of contract agriculture: consequences of concentration in input supply. *J. Agrib.* 18, 115–128.
- Harlan, J.R., de Wet, M.J., Desmond Clark, J., Cutler, H.C., Hallam, S.J., Edward Kidder Jr. J., Morris, E.A., Pickersgill, B., Posnansky, M., Sankalia, H.D., Sauer, J.D., Shaw, T., Whitaker, T.W., Yarnell, R.A. (1973).** On the Quality of Evidence for Origin and Dispersal of Cultivated Plants. *Current Anthropology*, 14 (1/2): 51–62.
- Haußmann B.I.G. and Parzies H.K. (2009).** Methodologies for generating variability. Part 1 Use of Genetic Resources in Plant Breeding. Chapter 5, Pages 107–128 in *Participatory Plant Breeding* (S Ceccarelli, EP Guimarães, E Weltzien and PG Rajendran, eds.). FAO, Rome, Italy. ISBN: 9789251063828.
- Hopkins M.A., Martin P.A., Nightingale P. Kraft A., Mahdi S. (2007).** The myth of the biotech revolution: An assessment of technological, clinical and organisational change. *Research Policy* 36 (2007): 566–589.
- Howard P. (2009).** Visualizing consolidation in the global seed industry: 1996–2008. *Sustainability* 1: 1266–1287.
- Hufford M.B., Berny Mier y Tieran J.C., Gepts P. (2019)** *Crop Biodiversity: An Unfinished Magnum Opus of Nature. Annual Review of Plant Biology* 70 (2019): 727–751.
- Lammerts van Bueren, E.T. and Myers, J.R. (2012).** *Organic Crop Breeding. John Wiley and Sons.*
- Lammerts van Bueren E.T., Wilbois K.-P., Østergård, H. (2007).** European perspectives of organic plant breeding and seed production in a genomics era. *Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics, Supplement 89: Organic Agriculture in the Tropics and Subtropics – Current Status and Perspectives.*
- Lammerts van Bueren, E.T., Jones, S. S., Tamm, L., Murphy, K.M., Myers, J.R., Leifert, C. and Messmer, M.M. (2011).** The need to breed crop varieties suitable for organic farming, using wheat, tomato and broccoli as examples: A review. *NJAS – Wageningen, Journal of Life Sciences* 580: 193–205.

- Messmer, M., Wilbois, K.-P., Baier, C., Schäfer, F., Arncken, C., Drexler, D., and Hildermann, I. (2015). Plant Breeding Techniques. An assessment for organic farming. FiBL Dossier No. 2. 2nd edition. Research Institute of Organic Agriculture, Frick (ISBN 978-3-03736-286-0): 48pp.
- Oehen, B. and Thommen, A. (2009). Workshop on cultivation and breeding techniques. 10th Scientific Conference on Organic Agriculture, Zürich, 11th–13th February 2009.
- Rete Semi Rurali (2016). Guida ai sistemi sementieri (ovvero tutto quello che si può fare o non fare con le varietà...). <https://bit.ly/2VtAF2C>.
- Rete Semi Rurali (2016). Gestione dinamica e partecipata di varietà e popolazioni. <https://bit.ly/2NBsdf0>.
- Scialabba N. (2007). Organic agriculture and food security (<ftp://ftp.fao.org/paia/organicag/ofs/OFS-2007-5.pdf>). FAO, Rome 3rd–5th May, 2007.
- Wolfe, M., Baresel, J., Desclaux, D., Goldringer, I., Hoad, S., Kovacs, G., Löschenberger F., Miedaner, T., Østergård, H. and Lammerts van Bueren, E. (2008). Developments in breeding cereals for organic agriculture. *Euphytica* 163, 323–346.
- Wyss, E., Lammerts van Bueren, E., Hulscher, M., Haring, M. (2001). Plant breeding techniques. An evaluation for organic breeding. FiBL Dossier No. 2. Research Institute of Organic Agriculture, Frick (ISBN 3-906081-13-3): 24pp.
- Zohary, D. (2004) Unconscious selection and the evolution of domesticated plants. *Economic Botany* (2004) 58: 5.



Nota tipografica

Edizione italiana a cura di

Rete Semi Rurali
piazza Brunelleschi 8, 50018 Scandicci (Fi), Italia
Tel. +39 (0)348 1904609
www.semirurali.net

Edizione originale pubblicata da

Research Institute of Organic Agriculture FiBL
Svizzera, Germania, Austria
www.fibl.org

Testo originale disponibile su <http://orgprints.org/29521/>

Autori seconda edizione 2015: Monika Messmer, Klaus-Peter Wilbois, Chris Baier, Freya Schäfer, Christine Arncken, Dora Drexler e Isabell Hildermann (tutti FiBL)

Autori prima edizione 2001, inoltre: Eric Wyss (FiBL), Edith Lammerts van Bueren (Louis Bolk Institute), Marjolein Hulscher (Louis Bolk Institute), Michel Haring (University of Amsterdam), Robert Haward (Soil Association), François Lhopiteau (ITAB), Eckard Reiners (Bioland)

Traduzione, aggiornamento e revisione ed. italiana

Riccardo Bocci, Gea Galluzzi, Matteo Petitti (Rete Semi Rurali)

Crediti immagini: Gabriela Brändle (Agroscope): p. 17; Beat Ernst, Basilea: p. 36 (1); Uwe Geier (Goetheanum): p. 37; Michel Häring (Universita Amsterdam): p. 25; Monika Messmer: pp. 1, 5, 51; Rete Semi Rurali: p. 36 (2); Jan Valema (Vitalis Organic Zaden BV): p. 16; Robert Weller, Bottmingen, Svizzera: p. 2/3.

Grafica edizione italiana: Niamh O'Meara - Daly (www.nomad.ie)

Grafica edizione originale: Claudia Kirchgraber e Brigitta Maurer (FiBL)

ISBN stampa 978-3-03736-129-0

ISBN web 978-3-03736-130-6

No. d'ordine FiBL 1120

Il dossier è disponibile gratuitamente per il download sotto www.semirurali.net e shop.fibl.org.

Tutte le informazioni contenute in questo dossier sono fornite alla migliore conoscenza degli autori e dell'editore. Tuttavia, gli errori non sono completamente esclusi. Pertanto, tutte le informazioni sono fornite senza alcun obbligo o garanzia da parte degli autori o dell'editore. Entrambi, pertanto, non si assumono alcuna responsabilità per errori di contenuto.

© Rete Semi Rurali, FiBL, 2019

Quest'opera è protetta da copyright in tutte le sue parti. Qualsiasi uso è vietato senza l'autorizzazione degli editori. Ciò vale in particolare per riproduzioni, traduzioni, microfilm, memorizzazione ed elaborazione in sistemi elettronici.

Questo lavoro è distribuito secondo la licenza Creative Commons - Non Commercial - ShareAlike 4.0 International.



L'edizione originale è stata creata con il contributo della Fondazione Mercator Svizzera, della Fondazione Mahle e dal Consorzio Europeo per il Miglioramento Genetico Vegetale Biologico (ECO-PB).



MAHLE STIFTUNG
GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG



