

Innovazioni nel miglioramento genetico convenzionale e biotecnologico delle piante da frutto

Silviero Sansavini e Luca Dondini

Dipartimento di Scienze Agrarie, Università di Bologna

Ricezione: 8 dicembre 2016; Accettazione: 29 dicembre 2016

Innovations in conventional and biotechnological breeding in fruit tree species

Abstract. A heated debate is currently taking place in the scientific community about the use of two distinct breeding approaches: the conventional breeding (based on crossing and selection assisted by molecular-selective technologies such as MAS and MAB) and the breeding that uses the new techniques made available by the modern biotechnologies (an alternative or complementary way to reach goals that are not achievable by conventional breeding). This second approach allows the transfer of resistance genes to pathogens or to abiotic stresses (such as drought, salinity and weather anomalies) as well as the improvement of the fruit nutritional value without affecting the quality standards of cultivars. Today, in addition to the classic transgenic approach (GMOs), the new plant breeding technologies (NPBT), such as "genome editing" and cisgenesis, are available. The genome sequence of the main fruit tree species and the support of specific molecular markers for the identification of gene responsible for target traits made the breeding goals achievable in a much shorter time. Protocols for the analysis of molecular markers (SSR, SCAR, SNP) linked to monogenic and polygenic traits (eg. QTLs), such as fruit quality traits, their sensory features and the tree adaptability to environmental conditions are available. The new genotyping technologies allow the early selection at genome level in each single plant as well as the screening germplasm (ancient genetic heritage) looking for genes (or gene allelic variants) with the aim to recover traits that have been lost during crop evolution or because of an environmental selective pressure. Furthermore, the markers are useful to "build" customized fruits to prevent diseases or to improve fruit quality and storage. The potential offered by new plant breeding technologies to the current breeding of fruit tree species are certainly achievable by cisgenesis (but with the risk

that the obtained plants will neither be admitted to field trials nor authorized for commercial release). As for genome editing (not to be confused with GMOs), the development of new technical CRISPR variants, adapted to fruit trees, is particularly crucial. In addition to the insertion of modification in the target regions and the guarantee of the absence of heterologous DNA, this will provide assurance on the variety genome preservation and the maintenance of the related fruit high quality standards.

Keywords: breeding, biotechnologies, cisgenesis, DNA editing.

Introduzione

La rivoluzione verde, che ha profondamente modernizzato l'agricoltura italiana nella seconda metà del secolo scorso, ha cambiato anche il volto della frutticoltura e della viticoltura, specie nelle regioni che più hanno contribuito a formare distretti frutticoli o viticoli specializzati, ad alta vocazione ambientale. Esempi eclatanti: melo nelle vallate alpine, il pero nella pianura padana, il pesco nella pianura romagnola, veneta e campana, l'uva in Puglia, il kiwi nel Lazio e nelle colline romagnole) la vite in quasi tutte le regioni italiane.

Come da tempo scrivono gli esperti, l'eccellenza produttiva italiana, e quindi la conquista dei mercati internazionali, è dovuta per una buona metà alle innovazioni varietali che hanno soppiantato, con la fine anticipata dei vecchi impianti, varietà obsolete, per lo più di origine straniera. Erano state introdotte, gradualmente, da un vivaismo divenuto molto attivo, quando fu ammessa, dagli anni '60, la tutela delle varietà brevettate, quindi l'esclusività dei diritti di propagazione vivaistica. L'Italia aderì all'internazionalizzazione delle regole predisposte dall'UPOV nel 1975.

Successivamente, l'Italia, prima presso istituzioni pubbliche e poi anche col diffuso concorso di Enti privati (editori, gruppi vivaistici, associazioni di pro-

* silviero.sansavini@unibo.it

duttori, amatori), ha intrapreso un'altra strada: quella di provvedere a costituire, in proprio, varietà mirate al soddisfacimento dei bisogni interni legati ai territori e alle tradizioni locali, all'andamento dei mercati già conquistati o da conquistare. Sono oltre cinquecento le varietà di specie temperate ottenute in Italia ed immesse sul mercato negli ultimi trent'anni.

Tutto ciò ha posto l'Italia all'avanguardia dell'innovazione varietale europea per specie quali melo, ciliegio, pesco-nettarine, kiwi, vite. Il miglioramento genetico è stato dunque potenziato in casa nostra ed è ormai chiamato a confrontarsi con quello estero per contribuire al continuo e necessario rinnovamento della frutticoltura, così come della viticoltura.

Purtroppo, il Ministero delle Politiche Agricole che per anni aveva sostenuto e coordinato i programmi pubblici per la creazione di nuove varietà da frutto o la selezione clonale (vedi vite) di quelle esistenti e più famose, ha drasticamente ridotto i propri interventi a sostegno del miglioramento genetico, mettendo in grave difficoltà le istituzioni pubbliche e lasciando in tal modo ai privati il compito di finanziare i programmi di *breeding* con la legittima ed ovvia finalità di assicurare loro la possibilità di ricavarne un ritorno economico a copertura degli investimenti richiesti, normalmente realizzabile solo dopo molti anni.

Programmazione del miglioramento genetico convenzionale e risultati dei progetti in corso

Ciò premesso, è evidente che il miglioramento genetico convenzionale, pur rimasto sostanzialmente lo stesso nel tempo, è attualmente oggetto delle innovazioni metodologiche conseguenti all'enorme potenzialità applicativa delle nuove tecnologie strumentali e digitali (vedi bioinformatica) che consentono di raggiungere gli obiettivi preposti in minor tempo, con maggiori probabilità di successo e con una minore onerosità e costi dell'intero processo creativo e selettivo.

Ma vediamo quali risultati sono stati recentemente conseguiti con le metodologie convenzionali per alcune specie.

Nel dopoguerra sono stati praticati sia la selezione clonale, a livello di modificazioni fenotipiche avvenute spontaneamente o attraverso l'utilizzo di tecniche d'irradiazione delle gemme (per le quali è stato utilizzato l'apposito campo della Casaccia-ENEA a Roma), sia il metodo convenzionale dell'incrocio seguito da selezione in campo delle progenie.

Dobbiamo in ogni caso distinguere da specie a specie: nel caso di melo e vite è prevalsa, per decenni, la selezione clonale operata da Enti pubblici e anche

da privati, favorita dall'obiettivo comune di individuare, moltiplicare e valorizzare il meglio del patrimonio genetico esistente. L'incrocio-selezione, quindi, è venuto dopo, in anni recenti.

Melo - Selezione clonale

Nel melo l'Italia ha importato per molti anni centinaia di mutanti naturali, scoperti e clonati per lo più negli Stati Uniti, Nuova Zelanda e Francia e introdotti in esclusiva da vivaisti che hanno poi trasferito agli editori aventi diritto, le royalties gravanti sulle piante (per molto tempo attestate intorno ad 1-2 €/pianta, ora, invece, variamente quantificabili, spesso con ancoraggio alla produzione). Ci sono varietà, come 'Gala' e 'Fuji', che hanno superato ciascuna una trentina di mutanti commerciali (varianti, queste, quasi unicamente della intensità e diffusione della pigmentazione rossa della buccia), altre, come 'Golden Delicious', in misura molto bassa, appena cinque mutanti, scelti perché dotati di una minore suscettibilità alla rugginosità o di una buccia più colorata, ed altre ancora, come 'Red Delicious', che hanno dato origine ad oltre un centinaio di mutanti commerciali, quasi tutti scelti per intensità ed estensione del colore rosso. Salvo alcune eccezioni (vedi l'INRA in Francia che ha prodotto un clone di 'Golden Delicious' irradiata, privo di rugginosità della buccia, ma anche meno produttiva), tutte le selezioni sono state individuate casualmente in frutteti, soprattutto americani, le cui piante hanno così generato una frequenza maggiore di quella italiana, mutanti ("sport") rivelatisi migliorativi rispetto ai cloni esistenti. Le cv 'Gala' e 'Fuji', in quanto diffuse in tutto il mondo, in Italia ogni anno si sono arricchite di nuove selezioni, con mele più colorate, spesso in modo da coprire la totalità della buccia (es. 'Gala SchniCo', 'Devil Gala', ecc.).

Ancora oggi l'assortimento varietale italiano è costituito per oltre il 70-75% da varietà policlonali così originatesi, difficilmente scalzabili dalle nuove varietà scaturite da programmi, pur ragguardevoli, di incrocio e selezione convenzionali, ma che nei nuovi impianti, numericamente e per livello qualitativo, non incidono per più del 10-15% delle varietà scelte, pur mettendo in conto in tale percentuale anche l'apporto del breeding estero. In altre parole le novità derivate da seme, ancorché molto valide, fanno sempre molta fatica ad entrare e a farsi strada nella coltivazione.

Vite - Selezione clonale

Nel caso della vite, invece, la selezione clonale non è scaturita da valutazioni individuali ed occasionali dei mutanti casualmente scoperti nei vigneti, bensì da programmi pubblici poliennali spesso finanziati dal

MIPAAF o dalle Regioni, basati su valutazioni comparative dei fenotipi più frequenti individuati nei più importanti vitigni (es. ‘Sangiovese’, ‘Nebbiolo’, ‘Malvasia’, ‘Sauvignon’, ‘Montepulciano’, ecc.). La tabella 1 rivela la enorme quantità di cloni accertati localmente in varie regioni. I rilievi sono stati condotti in ambienti tipici delle varie regioni (per disporre anche dell’interazione genotipo/clima) e con il concorso del comparto enologico e quindi della valutazione dei vini da parte degli specialisti ampelografi-enologi, patologi, esperti delle Cantine Sociali e gruppi vivaistici maggiormente interessati. Straordinario è l’esempio dei Vivai Rauscedo nel Veneto, che dispongono oggi della più ampia collezione di piante madri dei cloni selezionati, geneticamente certificati e registrati, dei principali vitigni italiani.

Per la vite alcuni dei parametri di maggior successo evidenziato col lavoro di selezione sono stati i profili aromatici di importanti vini, come ‘Pinot’, ‘Traminer’, ‘Sangiovese’, generati dalla variabilità in contenuto delle numerose componenti volatili (come terpeni e tioli) e il contenuto di composti antiossidanti (quali i polifenoli come il resveratrolo ed altri). Ma né nel melo né nella vite la selezione clonale è servita a vincere il grande problema ecologico-agronomico-sanitario della suscettibilità alle malattie più frequenti, che incidono pesantemente sui costi di produzione, sull’ambiente e sulla salubrità del prodotto.

Ibridazione ed incrocio

Fortunatamente, il breeding convenzionale per la resistenza alle malattie, tanto nel melo quanto nella vite, non è rimasto fermo. Sono stati condotti, infatti, da istituzioni pubbliche italiane programmi di ibridazio-

Tab. 1 - Vite: principali varietà italiane policlonali
Tab. 1 - Main polyclonal italian grapevine varieties.

Vitigno/ Cultivar	Numero di cloni	Vitigno Cultivar	Numero di cloni
Barbera	33	Pignoletto	4
Garganega	15	Primitivo	5
Glera	14	Raboso Piave	6
Grasparossa	4	Refosco p.r.	10
Greco	6	Riesling Italico	5
Lambrusco	4+4+n	Sangiovese	113
Malvasia bianca l.	7	Sorbara	4
Montepulciano	23	Tocai friulano	16
Moscato bianco	19	Trebbiano toscano	22
Nebbiolo	43	Verdicchio	13
Negro amaro	13	Vermentino	20
Picolit	5	Vernaccia S.G.	11
Totale			421

ne interspecifica, che hanno dato buoni risultati e che hanno fatto compiere alla nostra melicoltura e viticoltura grandi salti di conoscenza e di acquisizione di materiale genetico.

Vite. Si osserva oggi una iniziale inversione di tendenza: non più solo vitigni che danno prodotti -uva e vini- di alta qualità, ma cultivar adatte anche a nuovi indirizzi colturali sostenibili. E, se tale dev’essere l’opzione, si dovrebbe modificare l’attuale produzione e commercializzazione di vini DOC, inserendo anche uve prodotte dai nuovi ibridi europei ed italiani, fra cui le recentissime dieci varietà ibride dell’Università e dell’IGA di Udine, ottenute a partire dall’ibridazione di famosi vitigni (‘Tocai’, ‘Cabernet’, ‘Merlot’, ‘Sauvignon’) con linee parentali complesse contenenti geni di resistenza a peronospora derivati da *V. rupestris* (Rpv3 nell’LG 18) e *V. amurensis* (Rpv12 nell’LG 12), ma anche quelli di resistenza ad oidio derivati da *V. rotundifolia* (tab. 2) (Di Gaspero *et al.*, 2013, Giorgetti, 2016).

Secondo gli autori questi nuovi vitigni hanno già superato i test agronomici di produttività e quelli qualitativi sui vini (Testolin *et al.*, 2016). Il Ministero accoglierà la richiesta consentendo la vinificazione delle uve destinate a contribuire alle eccellenze DOC italiane? Oppure questa sarà consentita solo per la produzione di vini correnti? Altri *breeder* hanno selezionato vitigni interessanti per le qualità intrinseche delle uve e dei vini. È il caso ad esempio

Tab. 2 - Alcuni geni di resistenza a peronospora e oidio identificati in vite e utilizzati per il miglioramento genetico nel mondo (riassunto da Testolin *et al.*, 2016).

Tab. 2 - Genes for resistance to downy and powdery mildew identified in *Vitis* species and used for breeding (summarized from Testolin *et al.*, 2016)

Patogeno	Gene	Cromosoma	Fonte
<i>Plasmopara viticola</i>	Rpv1	12	<i>Muscadinia rotundifolia</i>
	Rpv2	18	<i>Muscadinia rotundifolia</i>
	Rpv3	18	<i>Vitis rupestris</i>
	Rpv8	14	<i>Vitis amurensis</i>
	Rpv10	9	<i>Vitis amurensis</i>
	Rpv12	14	<i>Vitis amurensis</i>
<i>Uncinula necator</i>	Run1	12	<i>Muscadinia rotundifolia</i>
	Run2	18	<i>Muscadinia rotundifolia</i>
	Ren1	13	<i>Vitis vinifera</i>
	Run4	18	<i>Vitis romanetii</i>
	Run5	14	<i>Muscadinia rotundifolia</i>

dell'Università di Bologna, che ha licenziato il vitigno 'Merlese' (tab. 3).

Straordinari anche i risultati conseguenti al programma di ibridazione dei portinnesti della vite, portati avanti dall'Università di Milano che ha recentemente licenziato quattro portinnesti portatori di varie resistenze geniche (Brancadoro *et al.*, 2016). Sono stati siglati M1, M2, M3 ed M4 e derivano da linee parentali complesse che comprendono le specie americane *V. riparia*, *V. berlandieri*, *V. cordifolia*, *V.*

rupestris e, in due di questi, *V. vinifera*. Questi soggetti risultano resistenti o tolleranti, sia pure in modo differente, a vari stress, deficit idrico (specialmente l'M4), eccesso di calcare (superando anche la soglia del 25%) e perfino salinità (M2 ed M4, con valori superiori a 4 ms/cm) (tab. 4).

Melo. Circa il melo, i programmi di ibridazione sono stati condotti da numerose istituzioni, presso Università e Centri di ricerca di quasi tutti i paesi

Tab. 3 - Nuove varietà di vite resistenti a peronospora e oidio (Testolin, 2016).
Tab. 3 - New grapevine varieties resistant to downy and powdery mildew (Testolin, 2016).

Varietà	Codice incrocio	Anno incrocio	Pedigree	Peronospora		Oidio scala 1-9*
				Rpv3	Rpv12	
Bacca bianca						
Fleurtaï	34.111	2002	Tocai friulano x 20/3	-	+	9
Soreli	34.113	2002	Tocai friulano x 20/3	+	+	9
Sauvignon Kretos	76.026	2003	Sauvignon x 20/3	-	+	5
Sauvignon Nepis	55.098	2002	Sauvignon x Bianca	+	-	9
Sauvignon Rytos	55.100	2002	Sauvignon x Bianca	+	-	9
Bacca rossa						
Cabernet Eidos	58.083	2002	Cab. Sauvignon x Bianca	+	-	9
Cabernet Volos	32.078	2002	Cab. Sauvignon x 20/3	-	+	5
Merlot Khorus	31.125	2002	Merlot x 20/3	-	+	7
Merlot Kanthus	31.122	2002	Merlot x 20/3	+	-	7
Julius	36.030	2002	Regent x 20/3	-	+	5

* 1 massima sensibilità - 9 massima resistenza

Tab. 4 - Genealogia e caratteristiche dei portinnesti della vite della serie M. (Brancadoro 2016).
Tab. 4 - Pedigree and features of the rootstocks of the M series for grapes (Brancadoro 2016).

Portinnesto	Genotipo materno	Genotipo paterno	Caratteristiche
M1	106/8 <i>Vitis riparia</i> × <i>Vitis cord.</i> × <i>Vitis rup.</i>	<i>Vitis berlandieri</i>	Resa all'innesto elevata Ridotto vigore Elevata resistenza alla clorosi ferrica Mediamente resistente alla salinità
M2	Teleki 8B <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>	333 E.M. <i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis berlandieri</i>	Resa all'innesto elevata Vigoria medio-alta Buona resistenza alla clorosi ferrica Buona resistenza alla salinità e allo stress idrico
M3	R 27 <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>	teleki 5C <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis riparia</i>	Resa all'innesto elevata Ridotto vigore Elevato assorbimento di potassio Bassa resistenza alla salinità Media resistenza alla siccità
M4	41 B <i>Vitis vinifera</i> × <i>Vitis berlandieri</i>	<i>Vitis berlandieri</i>	Resa all'innesto elevata Vigore medio Elevata resistenza alla salinità Ottima resistenza alla siccità

europei (tab. 5). La stessa Italia ha licenziato fino ad oggi una trentina ed oltre di varietà di melo, molte di queste dotate del gene Vf per la resistenza a ticchiolatura (alcune anche di Va) (es. ‘Golden Orane’, ‘Isaaq’, ‘Modi’), poche delle quali però giunte a incidere sulle varietà scelte per i nuovi impianti (non più dell’1-2% sul totale dei nuovi impianti). Contestualmente sono anche state scoperte provvidenziali fonti di resistenza a Venturia e ad altri patogeni presenti in alcune antiche varietà di melo del ricco germoplasma italiano. Fra queste si citano ‘Durello di Forlì’ e ‘Renetta Grigia di Torriana’; due varietà superate sul piano commerciale, ma importanti per la loro resistenza multigenica, inserite nel novero delle varietà europee oggetto di ricerche volte all’individuazione di geni di resistenza e da preservare per i futuri programmi di incrocio delle reti europee di miglioramento genetico e selezione delle nuove mele per colture eco-sostenibili.

Questi programmi per ora sono stati solo di tipo convenzionale, ma attraverso l’uso di tecnologie alternative non OGM, potrebbero essere ottenuti in futuro, se ne sarà incoraggiata e sostenuta la sperimentazione, risultati mirati, trasformando varietà note, con l’inserimento dei soli geni programmati.

Tutto ciò eviterebbe la variabilità indotta da caratteri indesiderabili, sempre presenti nelle progenie del breeding convenzionale, anche quando il processo selettivo è molto accurato. Per il momento, vista la situazione dell’Unione Europea, attestata sul rifiuto degli OGM, si dispone soltanto delle varietà ottenute convenzionalmente, ed in Italia, secondo quanto suggerito dal WG nazionale del MIPAAF sull’orientamento dei produttori, le varietà TR (Ticchiolatura resistenti) accettate e dichiarate valide sono una deci-

na: ‘Ariane’, ‘Isaaq’, ‘Modi’, ‘René’, ‘Crimson Crisp’, ‘Choupette’, ‘Story’, ‘Fujion’, ‘Galant’, ‘Topaz’, ‘Opal’, ‘Gold Rush’, metà delle quali sono italiane, ottenute da Gruppi privati e pubblici (tab. 6).

Se il breeding per le resistenze ha avuto l’impatto maggiore per avere introdotto altre resistenze (per es. al fire blight, all’afide grigio, al cancro da Nectria) su varietà non ancora coltivate in Italia, non meno importanti sul piano applicativo sono le varietà di melo migliorative della qualità del frutto. Alcune varietà estere introdotte con la formula del Club si sono imposte nei nuovi impianti (es. ‘Pink Lady’, ‘Kanzi’, ‘Ambrosia’, ‘Evelina-Pinova’, ‘Jazz’, ‘Fujon’). L’Italia finora ha contribuito con ‘Gold Chief’, ‘Majesty’, ‘Forlady’, ‘Sinfonia’.

Selezione forzata di melo e vite

Melo e vite sono le due specie che sono state prese a modello per questa nostra indagine. Meritano dunque di essere citate anche per due tecniche concettualmente molto diverse fra loro, che mirano ad un forte raccorciamento della fase di selezione dei semenzali e che per semplicità abbiamo definito di “selezione forzata”.

- Per la vite è stato proposto un metodo, cosiddetto “fuori suolo” in serra od altro ambiente protetto (Di Lorenzo, 1998), dove la concatenazione delle varie fasi progressive di crescita del semenzale sono rese continue e così accelerate da poter completare nell’arco di due anni l’intero ciclo di sviluppo e fruttificazione della vite. Un altro metodo veloce è stato messo a punto in Francia circa una cinquantina di anni fa (Huglin e Julliard 1964).
- Per il melo spiccano i recenti originali studi di E. Flachowsky (Julius Kühn Institute, istituto mini-

Tab. 5 - Miglioramento genetico del melo in Italia. Istituzioni pubbliche e private italiane che hanno attivato programmi di MG del melo fra il 1971 e il 2016.

Tab. 5 - Apple breeding in Italy. Public and private institutions that activated breeding programs since 1971 to 2016.

Enti	Numero incroci		Semenzali n°	Stadio moltiplicazione			Cv n°*
	Totale	Per anno		S1	S2	S3	
				N° selezioni			
AGRION CN	196	12	184.000	186	32	--	--
CIV FE	278	12	273.000	328	102	18	10
CREA FO	991	29	74.000	550	45	3	3
CSAF BZ	300	20	50.000	120	20	4	1
CMVF DCA BO	529	23	48.200	144	256	5	8
ISF TN (cessato)	824	48	51.000	409	16	4	11
FEM IASMA TN	405	68	140.000	12.000	280	30	2
UNIUD	120	-	8.048	1.993	-	-	-
Totale	3.643	212	728.248	15.730	751	64	39

Tab. 6 - Nuove mele diffuse in esclusiva in Europa (a Club o a contratto), al 2016.

Tab. 6 - New apple cultivars distributed with exclusive rights in Europe (to Clubs or with contracts) until 2016.

Varietà Club	Nome varietà	Resistenza a ticchiolatura (TR)
Ambrosia®	Ambrosia	
Antarès®	Dalinbel	
Cameo®/Camela®	Caudle/Cauflight	
Choupette®	Dalinette	TR
Crimson Snow®	MC38	
Diwa®/Junami®	Milwa	
Envy®	Scilate	
Evelina®	RoHo3615	
Galant®	Lumaga	TR
Greenstar®	Nicogreen	
Honeycrunch®	Honeycrisp	
Isaaq®	CIV323	TR
Jazz®	Scifresh	
Joya®	Cripps Red	
Juliet®	Coop43	TR
Kanzi®	Nicoter	
Les Naturianes®	Ariane	TR
Lola®	Maribelle	
Modi®	CIVG198	TR
Natyra®	SQ159	TR
Opal®	UEB32642	TR
Pink Lady®	Cripps Pink/Rosy Glow	
Redlove®	Luresweet	TR
Rockit®	PremA96	TR
Rubens®	Civni/Civnered	
SweeTango®	Minneiska	
Tentation®	Delblush	
	Belgica	
	Bonita	
Varietà libere		
Story®	Inored	TR
	Fujion	TR
	Gemini	TR
	Gaia	TR
	Smeralda	TR

steriale di Fruit Breeding di Dresda-Pillnitz, Germania) che, attraverso la tecnica della coltura in vitro di espianti temporaneamente trasformati geneticamente, dopo avervi inseriti geni florigeni prelevati da betulla (geni MADS-BOX), ha reso possibile l'immediata fioritura dell'asse vegetativo, ed anche la fruttificazione, compreso il completamento della formazione dei semi. Il metodo è unicamente sperimentale e sarà descritto nella

sezione dedicata alle nuove tecnologie per il miglioramento genetico.

Altri fruttiferi

Non da meno è l'importanza dei risultati del breeding di altre specie fruttifere, specialmente agrumi e fragola, tutti di grande impatto applicativo perché molte delle nuove varietà sono state inserite nei nuovi impianti, per coprire segmenti carenti o per colmare vuoti del calendario di maturazione o per affiancare o sostituire varietà estere, con le quali competere sui mercati.

Per l'albicocco, il ciliegio e il susino citiamo i contributi delle Università di Bologna e Milano e del CREA di Forlì/Cesena (le serie di ciliegi Star, es. 'Grace Star', e Sweet, es. 'Sweet Gabriel' e 'Sweet Lorenz'; Lugli *et al.*, 2012); per il kiwi c'è l'apporto delle due Università di Bologna e Udine (es. 'Kiwigiuro', 'Dori' e 'Soreli'), per la fragola del CREA di Forlì/Cesena (es. 'Pircinque'); per il pero le nuove varietà sono state realizzate dal CREA di Forlì/Cesena e dall'Università di Bologna (es. 'Carmen', 'Falstaff', 'Early Giulia').

Straordinari, per quanto riguarda il pesce e le nettarine, sono stati gli apporti del CREA di Roma, Forlì - Caserta, dell'Università di Firenze e di quella di Bologna - Milano e di numerosi privati, che qui è impossibile enumerare. Impossibile anche riportare i nomi di tutte le cultivar, sono oltre un centinaio; segnaliamo appena la serie Maria di Firenze (es. Maria Bianca, Maria Aurelia e Maria Dolce), 'Orion' e 'Venus' da Roma, 'Ambra' (Bologna), serie Romagna di pesche bianche ottenute a Faenza (scuola Caldesi).

I lettori, peraltro, possono consultare le monografie pubblicate recentemente dal CREA di Roma e di Forlì (Fideghelli 2011, Faedi *et al.*, 2015), dell'Università di Firenze (Bellini *et al.*, 2008) e dell'Università di Bologna (Sasnavini e Lugli, 2015) contenenti i profili delle centinaia di varietà licenziate da questi Enti.

Come già precisato, questo copioso materiale genetico è derivato da programmi poliennali non ancora ultimati, mentre con questa nota ci siamo proposti di esporre obiettivi e metodologie applicabili nei prossimi anni e quindi destinate a dare frutto in un futuro non prossimo. Rimandiamo pertanto alle citate pubblicazioni le informazioni sull'esistente.

Attualmente sono almeno quattro i punti caratterizzanti il nuovo *breeding* fruttivitecologico:

- obiettivi programmati (caratteri fenotipici specialmente del frutto; adattabilità, resilienza e resistenza ed avversità ambientali biotiche ed abiotiche)

del materiale selezionato; rispondenza creativa ed aspettative pratiche);

- utilizzo di strumenti sensoriali, di monitoraggio e di tecnologie di processo innovativi;
- definizione, validazione e comparabilità dei nuovi genotipi;
- accettabilità, promozione e lancio mercantile delle novità.

Obiettivi dei nuovi progetti

In generale, per le singole specie, gli obiettivi di oggi non coincidono più con quelli del passato, salvo per le caratteristiche di produttività degli alberi e per l'adattabilità ambientale, divenuta obiettivo prioritario. La quantità, cioè il livello della fruttificazione, è rimasta importante ma conta sempre di più la qualità del prodotto e la sua omogeneità, uniformità e costanza, stabilita secondo i nuovi parametri di gradimento del mercato e dei vari comparti della filiera (agronomici, merceologici, conservativi, di lavorazione commerciale e packaging, di logistica e distribuzione dei vari segmenti qualitativi e di mercato ecc.). Spicca, fra tutte, la qualità distintiva dei frutti (riconoscibilità fra gli altri) ed il livello di eccellenza estetica ed organolettica da raggiungere dalla stessa. Moltissimo contano anche altri pregi indiretti del frutto: epoca e concentrazione della maturazione (un tempo valeva di più la scalarità) con la qualità, la serbevolezza e la *shelf life*; poi l'habitus dell'albero e la sua governabilità e altri caratteri apparentemente secondari, come la capacità autodiradante delle infiorescenze in melo, pero e kiwi (al fine di evitare o ridurre il costo del diradamento), che cambiano da specie a specie o da luogo a luogo.

Nell'attuale, contingente, situazione evolutiva della frutticoltura è importante che qualsiasi novità possieda attributi compatibili con la sostenibilità ecologica della coltivazione e di gestione del frutteto o del vigneto; attributi che consentano un miglioramento dell'efficienza espressa dal rapporto fra interventi e loro costi e benefici (risultati). La novità, se valida, andrà inserita nei disciplinari di produzione delle varie colture, aggiungendo anche l'apprezzamento qualitativo e merceologico, tale da vincere il confronto con le altre varietà di pari epoca. L'adattabilità ambientale, e con essa l'insieme delle resistenze, rientrano nella definizione di resilienza, cioè la capacità dell'albero o del suo portinnesto di rispondere alle possibili difficoltà o sofferenze nel suo habitat di coltivazione (per esempio, adattabilità a deficit o eccesso idrico o nutrizionale, ridotta fertilità, e insufficienza, anche temporanea, di nutrienti nel suolo; eventi biotici

e climatici avversi, comprese le conseguenze del riscaldamento climatico globale).

Resistenze a stress biotici e abiotici

In tale contesto, un ruolo di primo piano hanno assunto, fra gli obiettivi dei nuovi programmi, le resistenze a stress biotici ed abiotici. Vi sono colture che richiedono non meno di venti-trenta trattamenti anti-parassitari annuali (vedi melo e vite), per cui la ricerca di geni di resistenza o tolleranza e il loro uso sia nel breeding convenzionale sia in quello alternativo sono diventati prioritari.

Portiamo come esempio tre casi.

Primo caso. Nel melo sono stati individuati altri geni oltre all'originario Vf (rinominato Rvi6) che inducono resistenza monogenica a *Venturia inaequalis* (agente eziologico della ticchiolatura), per cui finora sono state introdotte, col *breeding* convenzionale, oltre cento varietà di mele, alcune capaci di reggere anche il confronto con le migliori mele degli standard mercantili (es. 'Fujion', 'Galant', 'Modi', 'Opal', 'Story'; Gregori *et al.*, 2014).

Questa tecnica, che richiede molti anni di lavoro con incroci che arrivano alla quinta-sesta generazione (cioè oltre cinquanta-sessanta anni complessivi di lavoro) non è più sicura al cento per cento, come si ipotizzava in passato, perché la resistenza assoluta può essere "rotta" e quindi bypassata dal patogeno (come in effetti è già avvenuto in vari paesi) attraverso i suoi mutanti adattativi (causati dalla comparsa di ceppi o razze più virulente del patogeno; Beckerman *et al.*, 2016). La tecnologia è già ricorsa ad una implementazione di questo metodo con la cosiddetta "piramidizzazione" delle resistenze (cioè cumulando nello stesso albero più geni di resistenza alla stessa malattia), e poi integrando tale resistenza con altre.

Per esempio, in Svizzera, Germania e Olanda sono già state costituite nuove varietà di melo multiresistenti (es. cv 'Ladina' a Wadenswil), cioè immuni contemporaneamente a *V. inaequalis* (fungo), *Erwinia amylovora* (batterio, agente del colpo di fuoco), *Phodosphaera leucotricha* (fungo, agente dell'oidio), *Dysaphis plantaginea* (afide grigio).

La transgenesi ha già consentito ad una équipe italo-svizzera (Università di Bologna e ETH di Zurigo) di trasferire la resistenza indotta dal gene Vf derivato dal *Malus floribunda* 821 (il gene HcrVf2 mappato nel LG1) alla cv di melo 'Gala', rendendola in questo modo resistente alla ticchiolatura (Belfanti *et al.*, 2004). A differenza delle piante cisgeniche, il gene HCrVf2 lavorava sotto controllo del promotore 35S (isolato dal virus del mosaico del tabacco). Purtroppo, le disposizioni ministeriali italiane hanno

impedito che le piantine così ottenute (2002-2004) e allevate in serra potessero essere sperimentate in campo. Questo lavoro ha avuto però il merito di utilizzare per la prima volta un gene di melo per la trasformazione genetica di una varietà di melo e ha costituito le basi per la realizzazione della ‘Gala’ cisgenica resistente a ticchiolatura (Vanblaere *et al.*, 2011), come illustrato nel punto successivo.

Secondo caso. Un risultato positivo con entrambe le metodologie (convenzionale e transgenesi) è stato ottenuto anche per creare albicocche e susine resistenti a Sharka (*Plum Pox Virus*). Alcuni programmi internazionali di miglioramento dell’albicocco, grazie all’individuazione del locus PPVres nel LG1, presente in alcune vecchie varietà del germoplasma internazionale dell’albicocco, hanno portato alla creazione di nuove varietà resistenti al virus. Peraltro, il panel europeo e nord americano della resistenza a sharka è oggi costituito da 46 varietà accertate, per la maggior parte francesi, americane e canadesi, oltre alle italiane ‘Petra’, ‘Pisana’ e forse anche ‘Bora’ (Bassi *et al.*, 2016b).

Più complesso, invece, è il conferimento della resistenza a sharka nella specie pesco, a causa di oggettive maggiori difficoltà per l’ottenimento di piante resistenti. In questa specie non sono note sorgenti di resistenza monogeniche che possano essere sfruttate nel miglioramento genetico (la resistenza derivata da *Prunus davidiana* è poligenica; Decroocq *et al.*, 2005) e la via del trasferimento genico è particolarmente difficile in quanto il pesco è recalcitrante alla rigenerazione in vitro. Un network internazionale (Sharka on Peach; SHAPEA) guidato dal Prof. Bassi dell’Università di Milano, si è recentemente costituito per valutare gli approcci che permettano in futuro il raggiungimento in pesco dello stesso risultato acquisito nell’albicocco (Cirilli *et al.*, 2016). In Europa, per la prevenzione della Sharka, sono stati provvidenziali al riguardo i Progetti europei SharCo e Mars (Bassi *et al.*, 2016a e b) nonché, in precedenza, il progetto quinquennale MASpes, in Romagna, coordinato dall’Università di Bologna. Per ora i programmi sono stati portati avanti solo con metodi convenzionali di incrocio intervarietale. Non si sarebbe potuto fare altrimenti.

Per il susino europeo, in USA, attraverso la transgenesi è stata costituita una nuova varietà OGM (‘Honey Sweet’) ottenuta presso la Stazione di ricerca USDA di Kearneysville (in Pensilvania), varietà autorizzata dalle autorità USA per la propagazione commerciale (Ravelonandro *et al.*, 2013). Ma il costo complessivo sostenuto dall’USDA per l’approvazione del rilascio in campo della varietà e per la successiva

lunga procedura ufficiale, per metterla a disposizione della coltivazione industriale è stato proibitivo, così alto e tale da dissuadere l’USDA nella prosecuzione del programma e nel trasferimento applicativo della metodologia stessa messa a punto da Ralph Scorza (com. pers.).

Terzo caso. Esiste un terzo modello operativo per raggiungere l’obiettivo della resistenza, per es. quello della vite da vino (*Vitis vinifera*) per la quale nonostante le migliaia di varietà coltivate nel mondo, non sono stati ancora individuati geni di resistenza a *Plasmophora viticola* (la più pericolosa tra le crittogame), presente invece nelle varie specie di viti americane finora utilizzate quali portinnesti della *Vitis vinifera* (Zini *et al.*, 2015; Failla *et al.*, 2016; Scienza, 2016). In tal caso è dunque necessario ricorrere ad un trasferimento genico conseguibile con una delle varie tecnologie di transgenesi (OGM in senso ortodosso) oppure con metodologie alternative quali l’approccio cisgenico o il *genome editing*, tecnica illustrata di seguito.

Il Ministero si accinge ora a finanziare un progetto nazionale sull’uso di questa nuova tecnica, insieme alla cisgenesi, applicate alla vite e ai fruttiferi. Ma ciò che stupisce non è tanto il tardivo e benvenuto riconoscimento ministeriale di voler consentire alla nostra agricoltura di cogliere le nuove opportunità offerte dalla scienza, quanto l’impegno di cofinanziamento del progetto che, nelle attuali critiche e restrittive circostanze, è stato assunto da alcuni grossi imprenditori ed operatori del settore viti-enologico (che hanno costituito anche un Consorzio finalizzato all’obiettivo), nella speranza di poter disporre in futuro degli stessi grandi vini, oggi da loro prodotti, ma meno soggetti a contaminazioni perché ottenuti a partire da vitigni “modificati” (le stesse varietà di prima), ma non più soggetti alle malattie da respingere. Gli attuali metodi di cura o prevenzione ammessi dai disciplinari di produzione potrebbero infatti (volente o nolente) diventare ecologicamente insostenibili in un prossimo futuro (per la costante e necessaria limitazione richiesta all’uso di pesticidi), oltre che per la maggiorazione dei costi che questi comportano. Ci auguriamo che i nuovi progetti abbiano anche, come protagonisti, i sostenitori privati, pronti a far propri i risultati di queste nuove tecnologie alternative di *breeding*.

Le procedure per conseguire resistenze sono state naturalmente messe a punto e validate anche per altre specie, man mano che sono stati individuati geni di resistenza a siccità, salinità, alte temperature, freddo, non solo invernale, e altri fattori avversi alla coltivazione. È questo un campo di lavoro per il futuro: i metodi di lavoro sono specifici, ma le basi genetiche di

sensibilità e resistenza sono spesso comuni alle avversità dell'uno e dell'altro tipo, per cui sono sempre più numerosi i gruppi di lavoro internazionali che collaborano insieme. Ci sono anche varie associazioni scientifiche che alimentano gruppi di lavoro specializzati e che collaborano attraverso Workshop o Simposi a scambiarsi informazione e a diffondere il nuovo. Così fa anche Eucarpia, la cui Sezione frutticola di Genetica e Breeding, ha tenuto all'Università di Bologna il suo quadriennale Meeting internazionale nel giugno del 2015. Numerose sono le nuove tecnologie molecolari in fase di messa a punto. Ma occorre tempo.

Qualità del prodotto

C'è un altro obiettivo prioritario che sta entrando in molti programmi di breeding, perché non si può prescindere dalla definizione di nuovi parametri di qualità del frutto o dell'uva. Oltre ai tradizionali caratteri estetici e organolettici, che da sempre rispecchiano l'attrattiva, la gradevolezza e quindi il prezzo del frutto, stanno entrando in gioco altri caratteri, cosiddetti nutraceutici, che concorrono a definire il valore salutistico del frutto. Questi esprimono l'influenza e la presenza di decine, centinaia di molecole organiche, presenti in piccolissime quantità nel frutto di ciascuna varietà e che soltanto ora, con metodologie strumentali molto raffinate (cromatografia, iniezione su fibra e massa) possono essere individuate. Anche di queste componenti sarà possibile rintracciare le basi genetiche, e quindi mettere a punto metodi selettivi precoci (se ci sono geni noti e marcatori individuati) oppure, in alternativa, si dovrà procedere ad una selezione sulla base dell'analisi del prodotto raccolto, con forte allungamento dei tempi e aumento dei costi.

Riportiamo solo alcuni esempi degli aspetti attualmente in corso di studio su melo, pero, pesco:

- pigmentazione rossa di buccia e polpa
- polifenoli specifici legati al sapore della polpa e al grado di resistenza a malattie
- componenti zuccherine
- acidità
- sostanze volatili e aromi (sono centinaia)
- vitamine
- allergeni
- amminoacidi e proteine

Nel campo della serbevolezza e della shelf life la conoscenza dei geni precursori dell'etilene e delle varie componenti enzimatiche (es. poligalatturonasi) che controllano l'imbrunimento e il decadimento della polpa, a seguito delle nuove acquisizioni biochimiche e dei passaggi metabolici della catena possono essere individuati attraverso analisi e campionamenti a diversi stadi del frutto (Costa *et al.*, 2014).

Nuove strumentazioni e tecnologie innovative per il breeding dei fruttiferi

Le nuove tecnologie entrate recentemente nei processi di breeding sono state rese possibili dagli enormi progressi della biologia molecolare e dalle straordinarie innovazioni strumentali, opera di imprese private molto attive nella ricerca, che le hanno assecondate e sviluppate. Quelle più attuali ed interessanti che riguardano la frutticoltura, o già parte integrante di vari programmi italiani ed europei sono: a) la MAS (selezione assistita con marcatori), definita anche *Molecular breeding assisted selection*, e b) le tecnologie alternative (in quanto surrettizie delle tecniche di transgenesi, pur trattando di ingegneria genetica). Fra queste seconde ne sono state proposte in vari campi almeno una decina, ma ci limitiamo a presentarne due, le sole per ora "prese in considerazione" dal Ministero delle Politiche Agricole.

Vediamone singolarmente la natura, i settori di applicazione e di possibili sviluppi.

Tecniche di selezione molecolare assistita e precoce. Genotipizzazione con la MAS

Rappresentano una preziosa metodologia per semplificare, accelerare e rendere mirato il processo selettivo che, nei normali programmi di breeding, richiede, in campo, non meno di sei - dieci anni per il melo, e quattro - cinque anni per il pesco. Se però si considerano tutte le fasi dell'intero processo, tenendo conto anche delle necessarie valutazioni esterne, si giunge facilmente ad un periodo complessivo di quindici - venti anni per il melo e almeno otto - dieci anni per il pesco. Nel caso di selezione per le resistenze, riportato in precedenza, si interviene di regola gestendo le prime fasi dei semenzali in serra, per consentire gli inoculi artificiali delle giovani piantine (secondo - terzo anno), con spore, conidi o microrganismi verso cui saggiare la resistenza, in modo da poter ridurre drasticamente la popolazione di semenzali da valutare poi in campo (e quindi per ridurre i relativi oneri e costi).

La MAS è un processo integrativo e non alternativo di questa procedura standard di assessment biologico. Con l'uso della MAS, infatti, i semenzali, appena ottenuti, vengono sottoposti a test analitici di screening, mirati alla verifica della presenza dei geni per i quali si conduce la selezione attraverso l'uso dei marcatori ad essi associati. Tutto il resto è scartato, salvo non debba essere testato per altri caratteri.

Molti degli esempi sull'uso della MAS sono stati sviluppati in melo, specie divenuta "modello" per la ricerche di genomica, grazie soprattutto al contributo

dei progetti Europei Dare, HiDRAS, Isafruit e Fruit Breedomics e al programma di breeding molecolare americano RosBREED.

La MAS in melo è possibile per molti caratteri, ad esempio la resistenza a ticchiolatura, fire blight, oidio e afide grigio, consistenza e serbevolezza del frutto (Sasnavini e Tartarini, 2013; Ru *et al.*, 2015).

Nelle drupacee è possibile selezionare con marcatori molecolari per l'autocompatibilità e la dimensione del frutto in ciliegio (riassunto da Ru *et al.*, 2015), colore della polpa, data di maturazione e fenotipo pesca - nettarina in pesco (Dondini e Tartarini 2014). In quest'ultima specie, molti nuovi marcatori per la dimensione, il contenuto di zuccheri e acidi organici e la data di maturazione dei frutti sono stati identificati grazie all'impegno congiunto dei consorzi Fruitbreedomics e RosBREED (Fresnedo-Ramírez *et al.*, 2016).

Tutte queste applicazioni hanno fortemente beneficiato dello sviluppo delle moderne tecniche di sequenziamento che hanno portato alla disponibilità delle sequenze genomiche del melo, del pesco, del ciliegio, dell'actinidia, del pero e delle specie del genere *Citrus* come pure dello sviluppo di strumenti che consentono l'analisi di marcatori molecolari (principalmente SNP) a livello dell'intero genoma di una specie a costi relativamente contenuti (Dondini e Tartarini, 2014).

Nonostante le alte potenzialità e i successi ottenuti (Sasnavini *et al.*, 2004, Sansavini e Tartarini, 2011 e Ru *et al.*, 2015), questo approccio non è ancora ampiamente adottato per la selezione nelle specie appartenenti alle Rosacee. I principali elementi su cui lavorare riguardano da un lato lo sviluppo di schemi di MAS molto efficienti per selezionare contemporaneamente per caratteri di resistenza e qualità del frutto, dall'altro la semplificazione dell'accesso dei breeder privati ai servizi di analisi molecolare svolte da imprese private specializzate, affinché possano utilizzare le più moderne e innovative tecniche di genotipizzazione.

Uno studio pilota è stato condotto nell'ambito del Progetto Europeo Fruit Breedomics e ha coinvolto i gruppi di ricerca dell'Università di Bologna e della Fondazione Edmund Mach (San Michele all'Adige), nonché ACW di Wadenswil (Svizzera) nello sviluppo di un panel di marcatori SNP in grado di selezionare i semenzali ottenuti da numerose progenie di melo per una serie di caratteri quali la resistenza ticchiolatura (geni Rvi2, Rvi4, Rvi6, and Rvi15), oidio (gene Pl), afide grigio (gene Dp-fl), consistenza e serbevolezza del frutto (Md-ACS1, Md-ACO1 e Md-PG1).

La genotipizzazione, finalizzata alla selezione assistita (MAS) è stata effettuata con i test competitivi allelo-specifici denominati KASP™ (competitive

allele-specific PCR) effettuati presso la ditta di servizi di genotipizzazione LGC Genomics (Regno Unito) esattamente come avrebbe dovuto fare un breeder privato per il quale l'accesso alle piattaforme di genotyping non è semplice (fig. 1). In questo lavoro sono state analizzate con questi marcatori tutti gli individui appartenenti a 10 popolazioni di semenzali di melo per un totale di circa 5.700 semenzali. Tale approccio si è rivelato molto promettente anche in considerazione del fatto che i parentali usati nei programmi di incrocio avevano pool genici molto diversi ('Topaz', 'Milwa', 'Reka', 'Rewena', 'GoldRush', 'Realka', 'White Angel', 'Florina', 'Fuji', 'Grenoble', 'Royal Gala' e 'Perleberg', clone di 'Golden Delicious').

Questo studio apre una nuova prospettiva di fattibilità a programmi di miglioramento genetico che mirano alla piramidizzazione di geni di resistenza in nuovi genotipi di alto profilo qualitativo (Baumgartner *et al.*, 2016).

La medesima idea di fondo è stata alla base anche del progetto Europeo MARS per lo screening su vasta scala di semenzali di albicocco resistenti a Sharka. In questo caso il problema di fondo era rappresentato dal fatto che i marcatori sviluppati fino a pochi anni fa erano in grado di escludere il 100% di individui suscettibili al PPV (*Plum Pox Virus*) ma non erano in grado di selezionare con altrettanta efficienza per la resistenza (Decroocq *et al.*, 2014). Per questo motivo i breeder dell'albicocco (Università di Milano, Antakya e Brno; CEBAS-CSIC di Murcia, INRA di Avignone, USAMVB di Bucarest, FGI di Plovdiv, NAGREF di Naoussa), esperti di tecniche di biologia molecolare (INRA di Bordeaux, Università di Bologna e Milano), aziende private da anni coinvolte in questa ricerca (CRPV, CEP innovation, EFE Viveros del Sureste, Phytoria Karayiannis) e piattaforme per la genotipizzazione (ADNiD di Montpellier, FAL di Atene e Beta di Adana) si sono



Fig. 1 - Schema per l'applicazione della selezione assistita MAS (con marcatori SNP) presso una piattaforma di genomica
Fig. 1 - Application strategy of the Marker Assisted Selection (MAS) involving a genomic platform.

riuniti per analizzare un nuovo set di marcatori su oltre 20 semenzali derivati dai maggiori programmi di breeding Europeo per la selezione di nuovi genotipi resistenti a Sharka (Bassi *et al.*, 2016a e b).

Grazie a questo progetto è stata identificata una nuova regione distante 3 milioni di basi da quella principale che nel cromosoma 1 dell'albicocco controlla la resistenza a Sharka (Mariette *et al.*, 2016) e sono stati utilizzati 7 microsatelliti che coprono entrambe le regioni per un totale di 5 milioni di basi (Bassi *et al.*, 2016a).

I lavori citati sono solo alcuni esempi di programmi di *Marker Assisted Selection*, dai quali usciranno in futuro le nuove varietà di albicocco resistenti a PPV. L'esperienza maturata durante questo progetto servirà in futuro per affrontare lo stesso problema in pesco, specie nel cui germoplasma non sono presenti geni di resistenza specifici ma in cui la resistenza può essere introdotta per incrocio da mandorlo (Cirilli *et al.*, 2016). Questo approccio richiederà sicuramente tempi molto lunghi per arrivare a risultati interessanti per il mercato. Per questo le alternative metodologiche fornite dalle nuove tecniche di breeding dovranno essere valutate con attenzione (Cirilli *et al.*, 2016).

In pesco è stato recentemente pubblicato un lavoro in cui vengono descritti geni (identificati attraverso la tecnica del mappaggio per associazione) e, di conseguenza, nuovi marcatori molecolari SNP associati ad una serie di caratteri di grande interesse per il miglioramento genetico della specie quali il colore, la consistenza e l'acidità della polpa, il fenotipo della buccia pesco-nettarina, la forma del frutto, l'adesione della polpa a nocciolo e il sapore del seme (Cao *et al.*, 2016). Questo lavoro ha quindi integrato il panel di marcatori disponibili per la MAS già disponibili: colore della polpa (Adami *et al.*, 2013 e Falchi *et al.*, 2013), maturazione del frutto (Pirona *et al.*, 2013), genotipo pesco-nettarina (Vendramin *et al.*, 2014) e polpa stony hard (Pan *et al.*, 2015). Questi risultati sono stati possibili grazie alla disponibilità della sequenza genomica del pesco (Verde *et al.*, 2013) e degli strumenti di analisi che grazie a questa, sono stati realizzati (riassunto da Dondini e Tartarini 2014).

I lavori scientifici che erano stati pubblicati prima della disponibilità della sequenza genomica hanno avuto però l'importante merito di identificare, sulle mappe allora disponibili, le posizioni dei principali loci che controllano la qualità della pesca (Dirlewanger *et al.*, 1999, 2004, 2006; Yamamoto *et al.*, 2005) e si sono rivelati di grande utilità permettendo ai ricercatori di ancorare le informazioni genomiche da loro descritte alla sequenza genomica della specie, una volta che questa è stata disponibile.

Marcatori molecolari ed efficienza selettiva

Oggi lo sviluppo di marcatori molecolari è enormemente facilitato dalla disponibilità delle sequenze genomiche di numerose specie, quali ad esempio vite, melo, fragola, pesco, actinidia, banana, pero cinese ed europeo, come pure dalla forte riduzione dei costi di sequenziamento delle singole varietà di pregio (Dondini e Tartarini, 2014). Perché queste nuove opportunità per lo sviluppo e l'analisi massale di marcatori diventino veramente di routine bisogna prevedere, nel prossimo futuro, una pari efficienza nello studio e nella misurazione dei fenotipi in campo (alberi), in laboratorio (frutti), e in serra per le malattie.

Questa prospettiva sarà fondamentale soprattutto per disegnare nuovi marcatori in grado di identificare le varianti alleliche dei geni responsabili dei caratteri della qualità dei frutti. Questi caratteri sono infatti spesso di natura poligenica e coinvolgono l'attività di molti geni organizzati in complesse vie biosintetiche, attività che si riflette nella variabilità di questi caratteri in ciascuna cultivar (Dondini e Tartarini, 2014).

In ogni caso bisogna ricordare che anche se l'efficienza di incrocio e selezione è stata migliorata grazie alla MAS, nelle piante da frutto esistono limiti oggettivi dovuti a cause genetiche ben precise quali la poliploidia, gli alti livelli di eterozigosi delle varietà coltivate e l'auto-incompatibilità che rendono il miglioramento genetico attraverso l'incrocio un processo estremamente lungo e costoso, soprattutto quando i caratteri di interesse provengono da genotipi selvatici o da accessioni del germoplasma delle varie specie, la cui introgressione comporta purtroppo anche la comparsa di caratteri indesiderati. Questi problemi possono essere risolti con l'uso delle Nuove Tecniche per il Breeding nelle Piante (NBPT) che riguardano principalmente l'uso dell'ingegneria genetica ed in particolare del genome editing (Schaart *et al.*, 2016).

Le nuove tecniche per il breeding nelle piante: le piante cisgeniche e il DNA editing.

Il nuovo acronimo NBPT indica un nuovo gruppo di approcci biotecnologici (fra i quali la cisgenesi e il gene o genome editing) a sostegno dell'attività del miglioramento genetico delle piante.

Le piante cisgeniche

Le piante cisgeniche utilizzano le conoscenze sviluppate per la produzione delle piante transgeniche ma introducono un nuovo criterio alla base della scelta del gene da introdurre: si tratta in questo caso di una copia di un gene nativo completo di promotore e terminatore nativi, proveniente dallo stesso gene o

specie sessualmente compatibile con la varietà che si vuole trasformare (Schouten *et al.*, 2006). Nella sperimentazione dovranno inoltre essere utilizzati vettori privi di marker di selezione (de Vetten *et al.*, 2003) o geni di selezione che possano essere successivamente rimossi (Schaart *et al.*, 2004). La pianta così ottenuta non avrà perciò geni eterologhi (tab. 7).

Le piante cisgeniche hanno un grande potenziale per superare i ben noti limiti del miglioramento genetico tradizionale nelle piante da frutto. Durante il processo mirato all'introggressione di un solo gene utile (ad esempio un gene di resistenza) da una specie selvatica non si trasferisce solo il gene di interesse alle progenie, ma anche un segmento di regione del DNA della specie portatrice del gene ricercato. Questo fenomeno che è chiamato *linkage drag* costringe poi i breeder a numerose generazioni di incrocio per ripulire il contorno, cioè cercare di minimizzare gli effetti indesiderati di un genoma selvatico. Al contrario, attraverso la cisgenesi, si evita questo lungo percorso in quanto si inserisce il singolo gene in una varietà di pregio senza alterarne lo standard qualitativo e gli altri caratteri del fenotipo. Si tratta quindi di un metodo efficace per il miglioramento genetico nelle specie con genomi eterozigoti che si propagano per via vegetativa.

A sviluppo della sperimentazione condotta insieme all'Università di Bologna (in cui per la prima volta si è utilizzato il gene di melo HCrVf2 per ottenere linee di Gala GM resistenti a ticchiolatura; Belfanti *et al.*, 2004), l'ETH di Zurigo insieme ad un centro di ricerca olandese (PRI di Wageningen) ha realizzato una nuova mela 'Gala' "cisgenica" resistente a ticchiolatura. Come in precedenza, anche in questo caso si è utilizzato il gene HCrVf2 (Vanblaere *et al.*, 2011). In melo gli altri esempi importanti già realizzati riguardano da un lato l'introduzione di geni di resistenza

Tab. 7 - Classificazione dei prodotti finali ottenuti con le nuove tecniche di breeding (NPBT; modificato da Schaart *et al.*, 2016).
Tab. 7 - Classification of final products from New Plant Breeding Techniques (NPBT; modified from Schaart *et al.*, 2016)

Tecnica	Piante che contengono un nuovo DNA	Piante senza nuovo DNA ma con modificazioni del proprio DNA	Piante senza nuovo DNA e senza modificazioni del proprio DNA
Cisgenesi	Si	No	No
DNA editing	No	Si	No
Fast Breeding	No	No	Si
Innesto su portinnesto GM	No	No	Si

contro altre malattie quali il colpo di fuoco batterico (FB_MR5 di *Malus robusta*; Kost *et al.*, 2015), dall'altro la produzione di nuove tipologie di frutto a polpa rossa grazie all'introduzione del gene MYB (Krens *et al.*, 2015; esempi in figura 2).

Un approccio simile è stato sviluppato anche in fragola in cui è stata indotta resistenza alla botrite attraverso la sovraespressione di un gene per l'inibizione della sintesi delle poligalatturonasi fungine (Schaart, 2004).

La disponibilità dei genomi sequenziati moltiplicherà enormemente, in futuro, la capacità dei biologi molecolari di identificare nuovi geni funzionali per la realizzazione di piante cisgeniche, con caratteristiche migliorative non solo per la resistenza ai patogeni ma anche per la qualità dei frutti e la loro salubrità.

Nel caso della vite, la messa a punto della tecnologia cisgenica è iniziata all'IGA di Udine e mira all'introduzione di geni di resistenza a patogeni (Di Gaspero e Morgante, 2016).

Il genome editing

Il genome editing rappresenta un nuovissimo approccio finalizzato alla modifica di una specifica sequenza di gene mediante la rimozione o la sostituzione o anche l'aggiunta di singoli nucleotidi (tab. 7). Negli ultimi cinque anni sono state descritte, specialmente in campo umano, diverse tecniche in grado di ottenere questo risultato ma la più promettente, nel campo vegetale, è sicuramente l'ultima nata che è chiamata CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)–Cas (CRISPR-associated protein) system (riassunto da Kumar e Jain 2015). L'enzima CAS9 genera tagli nel DNA a doppia elica in prossimità di una sequenza complementare alla sequenza target di 20 nucleotidi dell'RNA a singola guida (sgRNA) che identifica la sequenza genica da modificare con altissima specificità (fig. 3). Questo sistema semplicemente mira a introdurre mutazioni nelle sequenze di DNA delle regioni fiancheggianti il

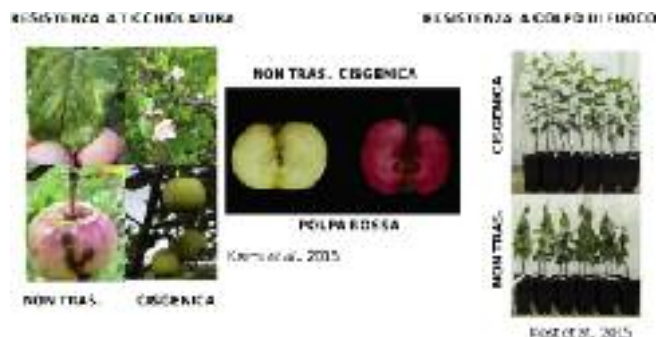


Fig. 2 - Esempi di meli cisgenici.
Fig. 2 - Examples of cisgenic apples.

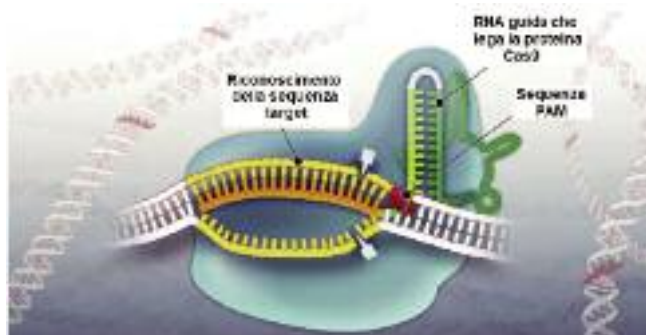


Fig. 3 - L'enzima CAS9 (blu) genera tagli nel DNA a doppia elica in una specifica regione vicino ad una sequenza PAM (da Protospacer adjacent motif, rosso) e a quella complementare alla sequenza target di 20 nucleotidi (arancione) dell'RNA guida (RNA singola guida). Questo sistema produce un taglio del DNA a doppia catena che induce il sistema di riparazione del DNA a rimpiazzare o interrompere le sequenze di DNA nelle regioni fiancheggianti il sito di taglio (modificato da Doudna e Charpentier 2014).

Fig. 3 - Scheme of the CRISPR. CAS9 (blue) enzyme cuts the double stranded DNA in a specific region next to a PAM (Protospacer adjacent motif, red) sequence and to the 20 bases target sequence recognized by the RNA guide. This system induces the DNA repair mechanism in replacing or deleting DNA sequences in the regions flanking the cut site (modified from Doudna and Charpentier 2014).

sito di taglio. La letteratura scientifica recente ha messo in luce le potenzialità di questa tecnica per indurre modificazioni genetiche mirate nelle piante.

L'applicazione di questa tecnica nelle specie arboree da frutto è ancora agli albori: il primo esempio riguarda una mutazione inserita in un gene della via di biosintesi dei carotenoidi in arancio dolce (Jia e Wang 2014) ma il mondo della ricerca sta già attivamente lavorando all'identificazione e alla modifica di altri geni target (Kanchiswamy *et al.*, 2015b). Anche diversi laboratori italiani se ne stanno occupando.

Fino ad oggi si è preferito inserire all'interno della pianta un costrutto codificante per l'RNA guida e la proteina Cas9, in modo che fossero le cellule vegetali stesse a produrre questi strumenti molecolari. Una volta inserita stabilmente la mutazione nel gene di interesse, il costrutto viene eliminato incrociando la pianta mutata con un genotipo non mutato al fine di selezionare le nuove piante sulla base dell'assenza del costrutto (analogamente a quanto fatto per il fast breeding che utilizza piante GM a fioritura continua). Questo approccio è molto efficace per le colture cerealicole in cui possono essere utilizzate linee pure ma non ha le stesse potenzialità nelle specie arboree da frutto in cui è importante mantenere il genotipo delle varietà di pregio.

Per questo si guarda con grande favore allo sviluppo di nuove varianti di questi protocolli che permettano l'introduzione diretta delle proteine Cas9 purificate

e dell'RNA guida nelle cellule vegetali senza l'uso di vettori plasmidici come nelle tecnologie GM (Kanchiswamy *et al.*, 2015a). In questo modo si parlerebbe di tecnologia non-OGM, cosa che non sarebbe ancora possibile affermare quando l'introduzione del sistema Cas9-sgRNA è mediato dall'uso di vettori classici quali l'*Agrobacterium*.

Tecniche quali la microiniezione o l'elettroporazione possono essere utilizzate per il trasferimento diretto nella cellula vegetale privata della parete cellulare (protoplasti) della proteina Cas e dell'RNA guida (Kanchiswamy *et al.*, 2015a). E' purtroppo noto che molte specie arboree da frutto sono recalcitranti alla rigenerazione di nuovi individui da protoplasti ed in letteratura è stata ampiamente descritta l'insorgenza di variabilità somaclonale per effetto della coltura in vitro di protoplasti (review di Bairu *et al.*, 2011). Il mantenimento degli alti standard qualitativi delle varietà di pregio è un prerequisito fondamentale per il successo del Genome Editing nelle specie arboree da frutto, per questo motivo sarà importante sviluppare nel prossimo futuro nuovi protocolli sperimentali in grado di garantire questo risultato.

Il "Fast Breeding"

L'induzione della fioritura precoce per accelerare i programmi di miglioramento genetico è stata applicata nelle specie quali il melo, il pero e il susino. Il sistema modello è stato sviluppato in melo in cui è stato sovraespresso dopo trasformazione genica un gene MADS-box di betulla (*Betula pendula*) in grado di indurre la fioritura in piantine entro il primo anno di vita (Flachowsky *et al.*, 2009, 2011). Queste linee di melo transgeniche sono stati poi utilizzati per un cosiddetto approccio 'Fast breeding' attraverso il quale diventa molto rapida l'introgresione ad esempio dei geni di resistenza alle malattie noti in letteratura (fig. 4). Una volta terminata la piramidizzazione dei geni è necessario selezionare, nell'ultima generazione di incrocio, gli individui che possiedono i geni di resistenza ma non il costrutto che induce fioritura precoce. In questo modo si otterranno piante non transgeniche perfettamente compatibili con quelle ottenute con breeding tradizionale in un tempo molto inferiore (Schaart *et al.*, 2016) (tab. 7). In melo questo approccio ha, infatti, già trovato utilizzo nel trasferimento di resistenze geniche a oidio, ticchialatura e colpo di fuoco batterico (Flachowsky *et al.*, 2011). In questo caso la selezione dei semenzali resistenti è stata supportata dall'utilizzo dei marcatori molecolari.

Perseguendo l'obiettivo di ottenere molte generazioni di incrocio in poco tempo, lo stesso gruppo di ricerca ha messo a punto uno nuovo strumento intro-

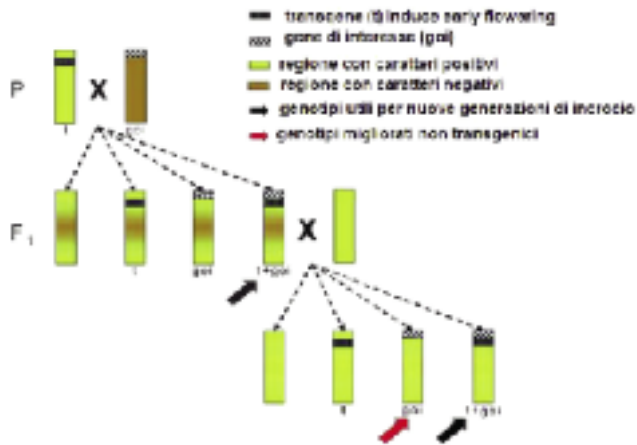


Fig. 4 - Schema di applicazione della tecnica "Fast Breeding" attraverso l'uso di piante transgeniche a fioritura precoce. Specie selvatica donatrice del gene di interesse (marrone); varietà con alti standard qualitativi (verde). Le frecce indicano i genotipi da selezionare (modificato da Flachowsky *et al.*, 2009).

Fig. 4 - Application strategy of the "Fast Breeding" approach using transgenic early flowering genotypes. Wild species containing the gene of interest (brown); high quality apple cultivar (green). Arrows show genotypes that have to be selected (modified from Flachowsky *et al.*, 2009).

ducendo nella cv di melo 'Pinova' il gene FLOWERING LOCUS T di pioppo (nelle forme PtFT1 e PtFT2) sotto il controllo di un promotore di soia inducibile al calore. Le linee transgeniche sviluppano i fiori dopo un trattamento a 42 °C per un'ora in un periodo di 28 giorni (Wenzel *et al.*, 2013). Non sono però ancora note applicazioni di questa nuova tecnologia ma il sistema è stato già reso disponibile anche in fragola in cui il silenziamento del gene Terminal Flower 1 (FaTFL1) ha indotto nella cultivar ottoploide 'Elsanta' la fioritura continua (Koskela *et al.*, 2016). Infine questo approccio di induzione di fioritura precoce attraverso trasformazione col gene Flowering Locus T1 è stato messo a punto anche in susino europeo (*Prunus domestica*) con la denominazione di "FasTrack" (Srinivasan *et al.*, 2012).

I prodotti finali ottenuti con queste tecniche altamente innovative di miglioramento genetico non presentano nessun frammento di DNA esterno e nessuna mutazione a carico del proprio corredo genetico.

Piante resistenti ai patogeni attraverso l'uso di portinnesti trasformati

Molto recentemente sono comparsi in letteratura nuovi lavori che descrivono l'uso di portinnesti geneticamente trasformati per trasferire resistenza a patogeni in varietà di pregio non trasformate dopo innesto (Schaart *et al.*, 2016). La tecnologia si basa sulle applicazioni del silenziamento genico mediante RNA interference (RNAi; Kalantidis 2004). Le piante utilizzano in natura piccoli RNA (*small interfering RNA* o

siRNA) per silenziare l'attività di determinati geni (tab. 7). Il silenziamento genico mediato siRNA è implicato nelle piante anche in risposte di resistenza a patogeni (Sharma *et al.*, 2013). L'efficacia dell'RNAi per ottenere resistenza ai virus è stata dimostrata in varietà di ciliegio dolce (*Prunus avium*) innestate su portinnesti transgenici (Song *et al.*, 2013; Zhao e Song 2014). Portinnesti Gisela 6 e 7 sono stati trasformati mediante l'introduzione di un vettore in grado di esprimere siRNA specifici contro la coat protein del virus *Prunus necrotic ringspot* (PNRSV). Successivamente è stata innestata su questi portinnesti GM la varietà di ciliegio dolce 'Emperor Francis' che ha successivamente acquisito una maggiore resistenza al virus per effetto del meccanismo di RNA interfering (fig. 5). Questi lavori descrivono per la prima volta la trasmissibilità di meccanismi di resistenza a virus fra portinnesti e varietà innestate altrimenti non resistenti.

Identificazione e denominazione di un nuovo genotipo

Il semenzale che ha superato tutte le fasi del processo selettivo in serra e in campo, ed a valle delle procedure biotecnologiche selettive eventualmente praticate in serra, pur possedendo i requisiti essenziali per il quale è stato selezionato dovrà affrontare un'ulteriore fase di valutazione del comportamento genera-

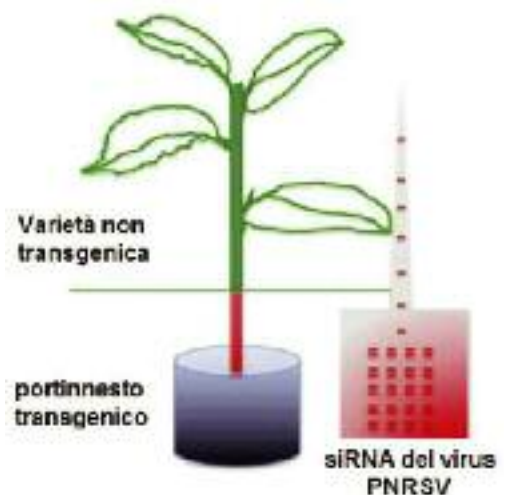


Fig. 5 - Schema di applicazione di una via alternativa per l'induzione di resistenza a virus: un portinnesto di ciliegio geneticamente modificato (Gisela 6) induce resistenza a PNRSV (Plant Necrotic Ring Spot Virus) virus nella varietà non trasformata di ciliegio 'Emperor Francis' su di esso innestata (modificato da Zhao e Song 2014).

Fig. 5 - Application strategy of an alternative approach for the induction of virus resistance: a GM cherry rootstock (Gisela 6) induces resistance to the PNRSV virus (Plant Necrotic Ring Spot Virus) in the grafted and not transformed cherry variety 'Emperor Francis' (modified from Zhao e Song 2014).

le dell'albero in vari ambienti vocati al melo, specie per gli aspetti agronomici e di produttività, seguito da una fase di test merceologico-mercantili sui frutti. In genere, per non allungare troppo la fase selettiva pre-lancio di una nuova varietà, ciascuna istituzione o breeder privato si organizza in modo che, quando si intravede il valore di una selezione, questa entra già a far parte di un programma di valutazione parallelo, esterno, attraverso la collaborazione di Centri di osservazione anche esteri, in modo che le valutazioni che ne scaturiranno siano "terze" (cioè "non obbedienti" al costitutore e non necessariamente concordanti) e disponibili al momento in cui si deve decidere se la selezione deve prendere nome ed essere lanciata come nuova varietà.

Anche la denominazione della varietà non è, e non deve essere, una scelta individuale del ricercatore-costitutore, come era in passato. Oggi la maggior parte dei programmi è sostenuta da budget gestiti da diverse figure (pubblico-privato). Spesso il privato è quello che mette l'ultima parola, approva o lascia libero il costitutore di decidere. Se ha finanziato l'intero programma potrebbe anche impedire il rilascio della novità, se non la considera valida dal suo punto di vista. Nella maggior parte dei casi, le parti interessate (costitutore ed editore) concordano il nome, cosicché ancor prima dell'uscita della novità può essere avviata la pratica di brevettazione, nazionale o internazionale che sia.

Per l'Europa occorre seguire la prassi amministrativa fissata dal CPVO di Angers, competente per le specie di fruttiferi temperati. Nel caso in cui si intenda entrare anche nel mercato, occorre stabilire se, oltre alla brevettazione o privativa comunitaria europea, si vuole anche tutelare il commercio in ciascun paese ove va depositato il marchio (contraddistinto da ®), necessario per tutelare la denominazione commerciale della varietà.

Troppo spesso i costitutori si affeziono sentimentalmente alle proprie varietà e non tengono abbastanza conto delle osservazioni pervenute da terzi o, se ci sono, non le gradiscono, perchè ciò può pregiudicare il successo commerciale delle novità. È anche dimostrato che alle ripetute osservazioni di campo occorre aggiungere almeno un paio di panel test sui frutti (svolti all'interno dell'istituzione, in annate diverse) e, possibilmente, una o più prove di consumer test in accordo con una GDO o con negozi specializzati, per valutare l'interesse e il gradimento dei consumatori. Occorre tenere in grande conto anche le osservazioni sullo stato sanitario dei semenzali (da valutare specificamente da parte di patologi, entomologi, batteriologi). Nondimeno, qualora si intraprenda

il percorso della certificazione genetico-sanitaria, sotto controllo dei funzionari dei Servizi fitosanitari regionali, occorre anche predisporre il mantenimento di pochi alberi in ambiente condizionato, protetto, da cui prelevare il materiale di propagazione di fonte certificabile.

Accettabilità e promozione mercantile della novità genetica

L'ultima fase dei programmi di breeding non è meno importante delle altre: se la varietà prodotta vuole conquistare l'apprezzamento dei potenziali coltivatori e in successione quello dei mercati, cioè trovare un suo spazio commerciale, occorre predisporre un piano, una sorta di flowchart delle varie operazioni necessarie per la propagazione, divulgazione e comunicazione, capace di raggiungere e convincere i vari soggetti della filiera. Non bastano più articoli su giornali e comunicazioni a convegni. Occorre incidere sulla realtà e trovare ascolto da parte dei decision maker, a cominciare dai vivaisti, fra cui scegliere uno o più esclusivisti, le Associazioni di produttori e relativi Consorzi cooperativi (che devono programmare gli impianti), i grandi rappresentanti della distribuzione (es. GDO, per sostenere i costi del lancio del prodotto), cercare di sottoscrivere contratti con tutti loro. Bisogna sperare, in ogni caso, che nell'arco degli anni previsti per la programmazione delle vendite delle piante e del conferimento del prodotto, ci sia la soddisfazione dei vari soggetti della filiera, impegnarsi attraverso gli accordi scritti. Tutto ciò in genere richiede l'intervento di un Editore, che provvederà anche a gestire la riscossione delle royalties sulle piante o sul prodotto raccolto, quando andrà a produzione il frutteto o il vigneto, oppure di un soggetto che si impegna a gestire l'intera filiera e quindi a curare i rapporti personali, a fare le necessarie verifiche (per cui alle spalle è bene anche disporre di un ufficio legale pronto ad intervenire). Qualora poi la varietà fosse diffusa sotto forma di Club, e comunque da parte dell'Editore si vogliano controllare anche superfici produttive, servizi e norme tecniche da rispettare nella coltivazione e nel mercato (per gli standard qualitativi), allora i compiti da svolgere sono tanti che è necessario disporre di una efficiente organizzazione, con un costo non irrilevante.

Nel caso del melo, sono all'incirca una trentina, nel mondo, le varietà diffuse a Club (una decina funzionanti in Italia) e per queste l'organizzazione che gestisce le varietà, ne cura o controlla anche il collocamento nel mercato, per salvaguardare qualità e influire possibilmente sul prezzo (es. mele 'Pink

Lady'). Il frutticoltore, come il vivaista, è un prestatore d'opera, vincolato da contratto, ma non dispone del prodotto che fornisce, è però responsabile della fornitura per il rispetto dei vincoli sottoscritti (Sasnivini e Guerra, 2015).

Nel caso dell'uva, le nuove varietà sono vincolate a superfici e produzioni, sulle quali le royalties vengono pagate a percentuale sulle fatture del prodotto venduto. Quindi non possono essere piccole aziende, a meno che queste non siano aggregate.

Non esiste una via unica per garantire il successo commerciale di una novità, ancorché questa sia diversa, più attraente, e possibilmente migliore, per qualità, di quelle di pari epoca. E nemmeno si può dire che sarà solo il mercato a deciderne il successo. Ci sono varietà di melo per le quali sono stati costituiti consorzi per la vendita, con un proprio apparato tecnico-amministrativo. Non è esagerato riconoscere che in alcuni casi, per lanciare e promuovere una nuova varietà, sono state spese somme considerevoli (anche più di un milione di euro).

È quindi evidente che le istituzioni pubbliche sono tagliate fuori da questa sorta di investimenti e quindi le varietà da esse ottenute entreranno molto lentamente a contatto dei soggetti che gestiscono la politica e la filiera distributiva delle varietà. Questa è una delle ragioni per cui oggi i programmi di breeding coinvolgono sempre più i privati, anche nel coinvestimento. Occorre, per questo andare cauti nella brevettazione, il cui costo (oltre 10.000 € per varietà) può essere ammortizzato solo quando si dispone del budget sufficiente. In genere, pertanto, vengono brevettate solo le varietà migliori e solo quando si è trovato, preventivamente, l'acquirente disposto a sostenerne l'onere, in quanto già orientato al successivo lancio della novità, con buone prospettive di gradimento del mercato.

Riassunto

Il miglioramento genetico può utilizzare le tecniche del breeding convenzionale, basato sull'incrocio-selezione e sulla selezione molecolare (MAS) o quelle del breeding biotecnologico per raggiungere obiettivi impossibili al breeding convenzionale. Le nuove tecniche di breeding (NPBT), quali ad esempio cisgenesi e DNA editing, offrono nuove potenzialità al miglioramento genetico sulle piante arboree: la cisgenesi permette di inserire geni di interesse in varietà di pregio ma richiede prove in campo e l'autorizzazione al commercio, mentre il genome editing richiede a monte varianti metodologiche che coniughino la capacità di inserire mutazioni in geni specifici al mantenimento del genoma delle varietà clonali di pregio.

Parole chiave: breeding, biotecnologie, cisgenesi, DNA editing.

Bibliografia

- ANDERSEN M.M., LANDES X., XIANG W., ANYSHCHENKO A., FALHOF J., THULIN ØSTERBERG J., OLSEN L.J., EDENBRANDT A.K., VEDEL S.E., JELLESMARK THORSEN, B., SANDØE P., GAMBORG C., KAPPEL K., PALMGREN M.G. 2015. *Feasibility of new breeding techniques for organic farming*. Trends Plant Sci., 20:426-434.
- BAIRU M.W., AREMU A.O., VAN STADEN J. 2011. *Somaclonal variation in plants: causes and detection methods*. Plant Growth Regulation, 63:147-173.
- BASSI D., DECROOCQ V., DONDINI L., FOSCHI S., GEUNA F. 2016a. *SharCo e MARS, due progetti europei per la resistenza a Sharka*. Rivista di frutticoltura e di ortofloricoltura, speciale albicocco, 78(5):20-23.
- BASSI D., DECROOCQ V., DONDINI L., FOSCHI S., GEUNA F., PASSARO M. 2016b. *Ricerca e diffusione di varietà resistenti a Sharka: due nuove cultivar precoci*. Rivista di frutticoltura e di ortofloricoltura, speciale albicocco, 78(5):24-27
- BAUMGARTNER I.O., KELLERHALS M., COSTA F., DONDINI L., PAGLIARANI G., GREGORI R., TARTARINI S., PATOCCHI, A. 2016. *Development of SNP-based assays for disease resistance and fruit quality traits in apple (Malus × domestica Borkh.) and validation in breeding pilot studies*. Tree Genetics & Genomes, 12:1-21.
- BECKERMAN J.L., SUNDIN G.W., GRADZIEL T.M., MITCHELL C.A., WHIPKEY A.L. 2016. *Scab and fire blight of apple: issues in integrated pest management*. Horticultural Reviews, 44:363-389.
- Bellini E. 2008. *Miglioramento genetico dei fruttiferi a Firenze*. Ed. Univ. degli Studi, Firenze, Dipartimento Ortofrutticoltura, pp. 236.
- BRANCADORO L. 2016. *Vite: i nuovi portinnesti serie M tollerano stress idrico e calcare*. L'Informatore Agrario, Supplemento Vite & Vino, 13:13-14.
- CAO K., ZHOU Z., WANG Q., GUO J., ZHAO P., ZHU G., FANG W., CHEN C., WANG X., WANG X., TIAN Z. 2016. *Genome-wide association study of 12 agronomic traits in peach*. Nature Communications, 7, 13246.
- CASTALDI R. 2016. *Viti resistenti in campo, un'opportunità da confermare*. L'Informatore Agrario, Supplemento Vite & Vino, 13:19-21.
- CIRILLI M., GEUNA F., BABINI A., BOZHKOVA V., CATALANO L., CAVAGNA B., DALLOT S., DECROOCQ V., DONDINI L., FOSCHI S., ILARDI V., LIVERANI A., MEZZETTI B., MINAFRA A., PANCALDI M., PANDOLFINI T., PASCAL T., SAVINO V., SCORZA R., VERDE I., BASSI D. 2016. *Fighting Sharka in Peach: Current Limitations and Future Perspectives*. Frontiers in Plant Science 7:1290.
- COSTA F., CAPPELLIN L., FARNETI B., TADIELLO A., ROMANO A., SOUKOULIS C., VELASCO R., SASNAVINI S., BIASIOLI F. 2014. *Advances in QTL mapping for ethylene production in apple (Malus × domestica Borkh.)*. Postharvest Biology and technology, 87:126-132
- DECROOCQ S., CHAGUE A., LAMBERT P., ROCH G., AUDERGON J-M, GEUNA F., CHIOZZOTTO R., BASSI D., DONDINI L., TARTARINI S., SALAVA J., KRŠKA B., PALMISANO F., KARAYIANNIS I., DECROOCQ V. 2014. *Selecting with markers linked to the PPVres major QTL is not sufficient to predict resistance to Plum Pox Virus (PPV) in apricot*. Tree Genetics and Genomes, 10:1161-1170.
- DECROOCQ V., FOULONGNE M., LAMBERT P., GALL O.L., MANTIN C., PASCAL T., SCHURDI-LEVRAUD V., KERVELLA, J. 2005. *Analogues of virus resistance genes map to QTLs for resistan-*

- ce to sharka disease in *Prunus davidiana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 272:680-689.
- DE VETTEN N., WOLTERS A.M., RAEMAKERS K., VAN DER MEER I., TER STEGE R., HEERES E., HEERES P., VISSER R. 2003. *A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop*. *Nature biotechnology*, 21:439-442.
- DI GASPERO G., MORGANTE M. 2016. *Nuove tecnologie genetiche al servizio della viticoltura*. *L'Informatore Agrario*, 21:55-57.
- DI GASPERO G., MORGANTE M., PETERLUNGER E., CASTELLARIN S.D., CIPRIANI G., TESTOLIN R. 2013. *Dall'Università di Udine nuove varietà vite resistenti alle malattie*. *Rivista di Frutticoltura*, 75(12):24-29.
- DIRLEWANGER E., COSSON P., BOUDEHRI K., RENAUD C., CAPDEVILLE G., TAUZIN Y., LAIGRET F., MOING A. 2006. *Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit*. *Tree Genetics & Genomes*, 3:1-13.
- DIRLEWANGER E., GRAZIANO E., JOOBEUR T., GARRIGA-CALDERÉ F., COSSON P., HOWAD W., ARÚS P. 2004. *Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae fruit crops*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:9891-9896.
- DIRLEWANGER E., MOING A., ROTHAN C., SVANELLA L., PRONIER V., GUYE A., PLOMION C., MONET R. 1999. *Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch)*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98:18-31.
- DONDINI L., TARTARINI S. 2014. *Dal sequenziamento dei genomi all'identificazione di geni che determinano o controllano caratteri importanti della qualità dei frutti: risultati e prospettive*. *Italus Hortus* 21:1-14
- DOUDNA JA, CHARPENTIER E 2014. *The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. *Science*, 346, 1258096.
- ESA 2015. *Regulatory approaches to modern plant breeding. The case of mutagenesis and new gene editing technologies*. ESA 150543, pp1-5, www.euroseeds.eu/esal150543.
- FALCHI, R., VENDRAMIN, E., ZANON, L., SCALABRIN, S., CIPRIANI, G., VERDE, I., VIZZOTTO G., MORGANTE, M. 2013. *Three distinct mutational mechanisms acting on a single gene underpin the origin of yellow flesh in peach*. *The Plant Journal*, 76:175-187.
- FAEDI W., BARUZZI G., LOVATI F., SBRIGHI P., LUCCHI P. 2015. *Monografia fragola*. Progetto MIPAAF liste di orientamento varietale dei fruttiferi, Volume terzo, pp 1-163.
- FAILLA O., BIANCO P. A., BRANCADORO L., TOFFOLATTI S.L., MADDALENA G., QUAGLINO F., RUSTIONI L., DE LORENZIS G., FIORI S., SCIENZA A., DI LORENZO S.G., MAGHRADZE D. 2016. *Il germoplasma di vite del Caucaso fonte di resistenza alle malattie e qualità delle uve*. *Rivista di Frutticoltura*, 78:24-28.
- FIDEGHELLI C. 2011. *Le varietà costituite dall'Istituto Sperimentale Frutticoltura ora CRA-Centro di Ricerche per la Frutticoltura*, MIPAAF, Roma, pp 405.
- FLACHOWSKY H., HANKE M.V., PEIL A., STRAUSS S.H., FLADUNG M. 2009. *A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants*. *Plant Breeding*, 128(3), 217-226.
- FLACHOWSKY H., LE ROUX P.M., PEIL A., PATOCCHI A., RICHTER K., HANKE M.V. 2011. *Application of a high-speed breeding technology to apple (*Malus* × *domestica*) based on transgenic early flowering plants and marker-assisted selection*. *New Phytologist*, 192:364-377.
- FRESNEDO-RAMÍREZ J., FRETT T.J., SANDEFUR P.J., SALGADO-ROJAS A., CLARK J.R., GASIC K., PEACE C.P., ANDERSON N., HARTMANN T.P., BYRNE D.H., BINK M.C.A.M., VAN DE WEG E., CRISOSTO C.H., GRADZIEL T.M. 2016. *QTL mapping and breeding value estimation through pedigree-based analysis of fruit size and weight in four diverse peach breeding programs*. *Tree Genetics & Genomes*, 12:-18.
- GIORGETTI P. 2016 *La situazione legislativa per le viti resistenti*. *L'Informatore Agrario, Supplemento Vite & Vino*, 13:8-9.
- GREGORI R., TARTARINI S., SANSAVINI S. 2014. *Nuove mele selezionate a Bologna per qualità e resistenza alla ticchiolatura*. *Rivista di Frutticoltura*, 76(12):28-36.
- HUGLIN P., JULLIARD B. 1964. *Sur l'obtention des semis de vigne très vigoureux à mise à fruits rapide et ses repercussions sur l'amélioration génétique de la vigne*. *Am. Amélior. Plants* 14:229-244.
- JIA H., WANG N. 2014. *Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA*. *PloS one*, 9(4), e93806.
- KANCHISWAMY C.N., MALNOY M., VELASCO R., KIM, J.S., VIOLA R. 2015a. *Non-GMO genetically edited crop plants*. *Trends in biotechnology*, 33:489-491.
- KANCHISWAMY C.N., SARGENT D.J., VELASCO R., MAFFEI M.E., MALNOY M. 2015b. *Looking forward to genetically edited fruit crops*. *Trends in biotechnology*, 33:62-64.
- KOSKELA E.A., SÖNSTEBY A., FLACHOWSKY H., HEIDE O.M., HANKE M.V., ELOMAA P., HYTÖNEN T. 2016. *TERMINAL FLOWER1 is a breeding target for a novel everbearing trait and tailored flowering responses in cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.)*. *Plant biotechnology journal*, 14: 1852-1861.
- KOST T.D., GESSLER C., JÄNSCH M., FLACHOWSKY H., PATOCCHI A., BROGGINI G.A. 2015. *Development of the First Cisgenic Apple with Increased Resistance to Fire Blight*. *PloS one*, 10(12), e0143980.
- KUMAR V., JAIN M. 2015. *The CRISPR-Cas system for plant genome editing: advances and opportunities*. *Journal of experimental botany*, 66:47-57.
- LUGLI S., CORREALE R., GRANDI M. 2012. *Serie Sweet: belle fuori, buone dentro. Sweet Series: beauties outside, delights inside*. *Frutticoltura - Supplemento al n. 11*:1-17.
- MARIETTE S., WONG JUN TAI F., ROCH G., BARRE A., CHAGUE A., DECROOCQ S., GROPPI A., LAIZET Y., LAMBERT P., TRICON D., NIKOLSKI M., AUDERGON J-M., ABBOTT A.G., DECROOCQ V. 2016. *Genome-wide association links candidate genes to resistance to Plum Pox Virus in apricot (*Prunus armeniaca*)*. *New Phytologist*, 209:773-784.
- PAN L., ZENG W., NIU L., LU Z., WANG X., LIU H., CUI C., ZHU Y., CHU J., LI W., FANG W., CAI Z., LI G., WANG Z. 2015. *PpYUC11, a strong candidate gene for the stony hard phenotype in peach (*Prunus persica* L. Batsch), participates in IAA biosynthesis during fruit ripening*. *Journal of experimental botany*, erv400
- PIRONA R., EDUARDO I., PACHECO I., DA SILVA LINGE C., MICULAN M., VERDE I., TARTARINI S., DONDINI L., PEA G., BASSI D., ROSSINI L. 2013. *Fine mapping and identification of a candidate gene for a major locus controlling maturity date in peach*. *BMC Plant Biology*, 13(166):1-13.
- RAVELONANDRO M., SCORZA R., POLAK J., CALLAHAN A., KRŠKA B., KUNDU J., BRIARD P. 2013. *"HoneySweet" Plum - A Valuable Genetically Engineered Fruit-Tree Cultivar*. *Food and Nutrition Sciences*, 4(06):45-49.
- RU S., MAIN D., EVANS K., PEACE C. 2015. *Current applications, challenges, and perspectives of marker-assisted seedling selection in Rosaceae tree fruit breeding*. *Tree Genetics and Genomes*, 11:1-12.
- SANSAVINI S., ANCARANI V. 2008. *Miglioramento genetico e nuove varietà di pero in Europa*, *Riv. di Frutticoltura*, 70(10):28-36.
- SANSAVINI S., GUERRA W., 2015. *Si allarga la filiera distributiva delle varietà brevettate*. *Rivista di Frutticoltura*, 77(11): 8-18.
- SANSAVINI S., LUGLI S. 2015 (a cura di) *50 anni di miglioramento genetico e 100 nuove varietà di piante da frutto e vite all'Alma Mater Studiorum*, Pàtron Editore, Bologna, pp 172.
- SANSAVINI S., TARTARINI S. 2013. *Advances in apple breeding and genetic control of the main agronomic resistance and fruit quality traits*, *Proc. of 13th Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics*, *Acta Hort.* 967:43-56.

- SANSVINI S., DONATI F., COSTA F., TARTARINI S. 2004. *Advances in apple breeding for enhanced fruit quality and resistance to biotic stresses: new varieties for the European market*. Journal Fruit and Ornamental Plant Research, 12(Spec. ed. 2).
- SCHAART J.G., KRENS F.A., PELGROM K.T., MENDES O., ROUWENDAL G.J. 2004. *Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene*. Plant Biotechnology Journal, 2:233-240.
- SCHAART J.G., VAN DE WIEL C.C., LOTZ L.A., SMULDERS M.J. 2016. *Opportunities for products of new plant breeding techniques*. Trends in plant science, 21:438-449.
- SCHOUTEN H.J., KRENS F.A., JACOBSEN E. 2006. *Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants*. EMBO reports, 7:750-753
- SHARMA N., SAHU P.P., PURANIK S., PRASAD M. 2013. *Recent advances in plant-virus interaction with emphasis on small interfering RNAs (siRNAs)*. Molecular biotechnology, 55:63-77.
- SONG G.Q., SINK K.C., WALWORTH A.E., COOK M.A., ALLISON R.F., LANG G.A. 2013. *Engineering cherry rootstocks with resistance to Prunus necrotic ring spot virus through RNAi mediated silencing*. Plant Biotechnology Journal, 11:702-708.
- SRINIVASAN C., DARDICK C., CALLAHAN A., SCORZA R. 2012. *Plum (Prunus domestica) trees transformed with poplar FTI result in altered architecture, dormancy requirement, and continuous flowering*. PLoS ONE 7, e40715.
- SCIENZA A. 2016. *Alla ricerca della vite perfetta: un sogno che si può avverare*. L'Informatore Agrario Supplemento Vite & Vino, 13:5-6.
- TESTOLIN R. 2016. *Viti resistenti alle malattie: tra innovazione e burocrazia*. L'Informatore Agrario, Supplemento Vite & Vino, 13:10-11.
- TESTOLIN R., PETERLUNGER E., CIPRIANI G., DI GASPERO G., CASTELLARIN S. D. 2016. *Una nuova viticoltura sostenibile con gli ibridi dell'Università di Udine*. Rivista di Frutticoltura, 78:28-33.
- VANBLAERE T., SZANKOWSKI I., SCHAART J., SCHOUTEN H., FLACHOWSKY H., BROGGINI G. A., GESSLER C. 2011. *The development of a cisgenic apple plant*. Journal of biotechnology, 154:304-311.
- VENDRAMIN E., PEA G., DONDINI L., PACHECO I., DETTORI M.T., GAZZA L., SCALABRIN S., STROZZI F., TARTARINI S., BASSI D., VERDE I., ROSSINI L. 2014. *A unique mutation in a MYB gene cosegregates with the nectarine phenotype in peach*. PLoS ONE 9(3): e90574, 1-13.
- VERDE I., ABBOTT A.G., SCALABRIN S., JUNG S., SHU S., MARRONI F., ZHEBENTYAYEVA T., DETTORI M.T., GRIMWOOD J., CATTONARO F., ZUCCOLO A., ROSSINI L., JENKINS J., VENDRAMIN E., MEISEL L.A., DECROOCQ V., SOSINSKI B., PROCHNIK S., MITROS T., POLICRITI A., CIPRIANI G., DONDINI L., FICKLIN S., GOODSTEIN D.M., XUAN P., DEL FABBRO C., ARAMINI V., COPETTI D., GONZALEZ S., HORNER D.S., FALCHI R., LUCAS S., MICA E., MALDONADO J., LAZZARI B., BIELENBERG D., PIRONA R., MICULAN M., BARAKAT A., TESTOLIN R., STELLA A., TARTARINI S., TONUTTI P., ARÚS P., ORELLANA A., WELLS C., MAIN D., VIZZOTTO G., SILVA H., SALAMINI F., SCHMUTZ J., MORGANTE M., ROKHSAR D.S. 2013. *The high-quality draft genome of peach (Prunus persica) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution*. Nature Genetics 45:487-494.
- WENZEL S., FLACHOWSKY H., HANKE M.V. 2013. *The Fast-track breeding approach can be improved by heat-induced expression of the FLOWERING LOCUS T genes from poplar (Populus trichocarpa) in apple (Malus domestica Borkh.)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 115:127-137.
- Yamamoto T., Yamaguchi M., Hayashi T. 2005. *An integrated genetic linkage map of peach by SSR, STS, AFLP and RAPD*. J. Japan. Soc. Hort. Sci, 74:204-213.
- ZHAO D., SONG G.Q. 2014. *Rootstock-to-scion transfer of transgene-derived small interfering RNAs and their effect on virus resistance in nontransgenic sweet cherry*. Plant biotechnology journal, 12:1319-1328.
- ZINI E., RAFFEINER M., RAIFER B., TERLETH J., LETSCHKA T. 2015. *Ricerca su viti resistenti in Alto Adige*. Rivista di Frutticoltura, 77:20-25.
- ZULINI L., STEFANINI M. 2016. *Il miglioramento genetico alla Fondazione Mach*. L'Informatore Agrario, Supplemento Vite & Vino, 13:16-18.