Ital. J. Agron. / Riv. Agron., 2009, 1 Suppl.:69-79

L'ortoflorofrutticoltura italiana al cospetto delle nuove opportunità offerte dalla genetica e dalla genomica di settore

Andrea Allavena[1], Lorenzo Corino[2], Roberto Quarta[3], Giuseppe L. Rotino[4], Riccardo Velasco[*5]

[1]*CRA – Dipartimento di Biologia e Produzione Vegetale, Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali*
Corso degli Inglesi 508, 18038 Sanremo (IM)
[2]*CRA – Dipartimento di Biologia e Produzione Vegetale, Centro di Ricerca per l'Enologia*
Via Pietro Micca 35, 14100 Asti
[3]*CRA – Dipartimento di Biologia e Produzione Vegetale, Centro di Ricerca per la Frutticoltura*
Via Fioranello 52, 00134 Roma
[4]*CRA – Dipartimento di Biologia e Produzione Vegetale, Unità di Ricerca per l'Orticoltura*
Via Paullese 28, 26836 Montanaso Lombardo (LO)
[5]*Istituto Agrario San Michele all'Adige – Fondazione E. Mach, Dipartimento di Genetica e Biologia Vegetale*
Via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN)

Società Italiana di Genetica Agraria

Riassunto

L'orto-floro-frutticoltura italiana ha l'occasione di rilanciare la ricerca italiana nel settore della genomica dopo una fruttuosa serie di rilevanti investimenti che hanno portato al sequenziamento del genoma della vite, ed oggi puntano al genoma del pesco, del melo e di altre specie economicamente rilevanti. La genomica vegetale riscatta una fuoriuscita anzitempo dell'impegno italiano sui genomi, e pone le basi per una ricerca avanzata che necessita ulteriori sforzi per vedere il completamento della propria opera con le applicazioni delle conoscenze acquisite nel miglioramento genetico assistito e nelle applicazioni biotecnologiche. Esempi di rilevante successo realizzati da istituti di ricerca italiani nel settore vengono qui descritti.

Parole chiave: sequenziamento di genomi, biotecnologie vegetali, ortoflorofrutticoltura, genomica vegetale.

Summary

ITALIAN HORTICULTURE, FRUITCULTURE AND FLORICULTURE MAY GAIN FUNDAMENTAL ROLE BY NEW OPPORTUNITIES OFFERED BY GENETICS AND GENOMICS

Horticulture, fruitculture and floriculture in Italy have the opportunity to highlight the Italian research on plant genomics, following a fruitful series of investments leading to the sequencing of the grapevine genome, and today to the peach and apple genomes, with further species of economical interest that will follow. Plant genomics recover the Italian role of Italy on genomics, and pose the basis for advanced research which needs further efforts to see the workflow completed, from assisted breeding to applied biotechnology. Successful example of research work made by Italian institutes in plant genomics of horticulture, fruitculture and floriculture will follow.

Key-words: genome sequencing, plant biotechnology, horti-fruit-floriculture, plant genomics.

[*] Autore corrispondente: tel.: +39 0461 615314; fax: +39 0461 615372. Indirizzo e-mail: riccardo.velasco@iasma.it

Introduzione

Tra le varie branche dell'agricoltura italiana spetta curiosamente a questo ampio settore, l'ortoflorofrutticoltura, rilanciare la ricerca italiana nelle genetica agraria e più propriamente nella genomica vegetale. Perso il treno nella genomica umana, quando con estremo rammarico del premio Nobel Dulbecco, l'Italia rinunciò al sequenziamento del cromosoma Y dell'uomo, la ricerca nazionale non è riuscita ad agganciare le grandi imprese del settore vegetale che hanno rappresentato altre pietre miliari nella ricerca internazionale quali il sequenziamento del genoma dell'Arabidopsis, la pianta modello per i genetisti vegetali al pari della drosofila per i genetisti animali, o la costituzione e lo sfruttamento per scopi conoscitivi delle grandi collezioni di mutanti per studi di *reverse genetics* che hanno portato alle maggiori scoperte degli ultimi dieci anni. Dicevamo sopra, curiosamente, poiché l'ortoflorofrutticoltura non rappresenta quei settori agrari di maggiore forza e dimensione quali il cerealicolo o lo zootecnico, bensì settori talvolta di nicchia, talvolta di forte interconnessione paesaggistico-turistica che rende il nostro Paese una grande attrazione turistica ma non certo un Paese fortunato per orografia e caratteristiche dei terreni poco adatti ad una agricoltura intensiva e remunerativa. La peculiarità del nostro Paese, forte di un clima invidiabile e di una piccola imprenditoria diffusa, ha nell'ortoflorofrutticoltura un punto di forza e proprio da questo settore viene l'occasione del rilancio, che non a caso ha visto, da parte di alcuni centri di ricerca affacciati del panorama internazionale, un forte impegno sia nel reperire i fondi che nello sfruttamento pieno di questa occasione. Di seguito si descriveranno alcuni dei risultati che hanno portato la ricerca italiana del settore a recuperare una certa credibilità con risultati importanti che vanno dalla partecipazione italiana al sequenziamento del genoma della vite, che ha visto addirittura l'Italia protagonista in due progetti indipendenti, ma complementari, raggiungere entrambi nel 2007 il sequenziamento del genoma di due genotipi di vite, uno coltivato e l'altro omozigote, con grandi potenzialità di applicazione nel miglioramento genetico della specie; ma non solo, prosegue con la realizzazione di altri progetti di sequenziamento che vedono gli istituti italiani protagonisti quali il sequenziamento del genoma del melo e del pesco, che si affiancano al sequenziamento del cromosoma 12 del pomodoro e del cromosoma 5 del grano recentemente finanziati dai Ministeri dell'Agricoltura e dell'Università e Ricerca Scientifica. A queste eccezionali esperienze si aggiungono le competenze nella genomica funzionale applicata ad alcuni ortaggi, su tutti la melanzana e il pomodoro, ma anche alle piante ornamentali, le quali presentano una plasticità straordinaria e rappresentano una forte peculiarità del nostro Paese.

Risultati

Negli ultimi 4-5 anni il panorama della ricerca italiano, pur soffrendo croniche carenze di finanziamento, ha raggiunto alcuni obiettivi che possono rilanciare la ricerca italiana nel mondo, se opportunamente sostenuti. Di seguito si riportano alcuni esempi di rilevanti risultati ottenuti da centri di ricerca italiani nella genetica e nella genomica vegetale, sottolineando che sono solo alcuni dei risultati presentabili in un contesto relativamente limitato e che vogliono rappresentare solo alcuni esempi tra i numerosi disponibili.

Floricoltura

Le specie ornamentali sono molto numerose ed a parte Rosa, Crisantemo, Lilium e Garofano si caratterizzano per possedere ciascuna una modesta importanza economica, complessiva e nel settore. Ciascuna specie mostra un'ampia variabilità genetica, fornisce prodotti distinti (es.: fiore reciso o pianta in vaso) e può essere impiegata per fini diversi (pianta da appartamento, giardino, aree pubbliche, aree degradate, ecc.). Le specie ornamentali si caratterizzano inoltre per avere strategie riproduzione differenziate e possono manifestare poliploidia, autoincompatibilità, sterilità. Sul mercato sono considerate un bene voluttuario e come tali si comportano nei confronti della domanda/offerta. Il consumatore esige un prodotto perfetto, chiede nuove varietà e cambia rapidamente il gusto. Le informazioni scientifiche sulle specie ornamentali sono generalmente scarse, a parte alcune eccezioni. La Rosa ad esempio è considerata una specie modello nella famiglia delle *Rosaceae* in conseguenza del suo genoma relativamente piccolo

ed è la specie più studiata dal punto di vista genetico; per essa si dispone una mappa genetica e di marcatori associati a caratteri di rilevante interesse. Le basi molecolari di caratteri come il profumo, l'attitudine alla rifiorenza e la resistenza ad alcune malattie come il blackspot sono state investigate in dettaglio. Altre specie su cui si è concentrata l'attenzione dei ricercatori sono: *Anthirrinum* (forma dei fiori), *Petunia* (espressione di transgeni), *Pharbitis* (induzione della fioritura), *Antirrhinum*, *Phalaenopsis* e *Clarkia* (controllo del profumo).

Nelle piante ornamentali, obiettivi di ricerca, che trovano nelle biotecnologie lo strumento principale di lavoro, sono il controllo dell'epoca e dell'abbondanza di fioritura, la modifica della forma e del colore dei fiori, l'allungamento della vita dei fiori recisi e delle piante in vaso in ambiente domestico, il controllo della crescita e dell'architettura della pianta anche in condizioni di elevata densità di coltivazione e di scarsa intensità luminosa, il miglioramento del profumo della vegetazione e dei fiori, la resistenza agli stress.

In contrasto con le potenzialità offerte dalle biotecnologie, nel campo delle specie ornamentali, la ricerca italiana nel settore si è mostrata piuttosto limitata. L'unica eccezione è rappresentata dalle colture *in vitro*, utilizzate da numerosi laboratori privati e pubblici, finalizzate alla propagazione delle nuove costituzioni, al risanamento da virus ed al mantenimento di materiali in assenza di patogeni. Tra le applicazioni specifiche delle colture *in vitro* sono da ricordare la coltura di antere di Anemone utilizzata per la produzione di linee pure androgenetiche da impiegare nella costituzione di ibridi F1 (Laura et al., 2006a), l'induzione di hairy roots e la produzione di biomassa da destinare all'estrazione di metaboliti secondari (Bertoli et al., 2008).

Agli inizi degli anni Novanta è stata avviata una consistente attività di trasformazione genetica. La collaborazione tra laboratori nazionali diversi ha portato alla costituzione di genotipi di *Osteospermum* con modificata architettura della pianta mediante espressione dei geni *rol* (Giovannini et al., 1999) e resistenti a TSWV mediante integrazione del gene del nucleocapsidio del virus stesso (Vaira et al., 2000). In Petunia sono stati ottenuti genotipi tolleranti a *Botrytis cinerea* mediante espressione del gene *ech*-42 di *Trichoderma harzianum* (Esposito et al., 2000). Successivamente i geni *rol* sono stati utilizzati per ridurre la taglia della pianta anche in *Limonium* (Mercuri et al., 2001a) mentre genotipi di *Osteospermum* resistenti agli stress sono stati ottenuti sovra esprimendo il gene *Myb4* di riso. (Monica Mattana, comunicazione personale). Nonostante la rilevanza dei risultati conseguiti, questi lavori non hanno portato a ricadute pratiche per il clima anti OGM lievitato in Italia e nell'Unione Europea. Ben maggiore clamore ha avuto sui media l'ottenimento di fiori fluorescenti in conseguenza dell'espressione in *Osteospermum* ed *Eustoma* del gene *GFP* (Mercuri et al., 2001b). Al momento l'attività d'ingegnerizzazione delle ornamentali è limitata agli studi di genomica funzionale.

I marcatori molecolari sono una tecnologia largamente utilizzata nei laboratori di ricerca pubblici. L'importanza delle informazioni e delle utilizzazioni dei marcatori molecolari comincia ad essere sentita anche da parte delle aziende. In conseguenza della loro indipendenza dai fattori ambientali, i marcatori molecolari sono stati utilizzati nelle specie ornamentali principalmente per la distinzione varietale. L'utilizzazione di AFLP in Anemone ha permesso di distinguere le 5 varietà in prova e raggrupparle in insiemi coerenti con le informazioni disponibili sull'origine delle varietà stesse (Laura et. al., 2006b). Analogamente, marcatori molecolari di varia natura hanno confermato la netta separazione delle varietà di *Hibiscus rosa sinensis* dalle varietà di *H. syriacus*. *H. arnottianus* parentale di *H. rosa sinensis* è stato posizionato dall'analisi in una sottobranca separata ma interna al gruppo delle cvs di *H. rosa sinensis* (Bruna et al., 2008). La capacità discriminante e l'efficacia di marcatori AFLP, STMS ed EST è stata valutata per distinguere varietà di Azalea (Scariot et al., 2007). Marcatori molecolari di varia natura sono stati utilizzati anche in *Osteospermum* (Faccioli et al., 2000), Rosa (Scariot et al., 2006), Oleandro (Portis et al., 2004) per la distinzione varietale, in Mirto per la distinzione di genotipi provenienti da varie aree del bacino del mediterraneo (Bruna et al., 2007), in *Limonium* per la distinzione delle specie e degli ibridi derivati (Bruna et al., 2005), in *Alstroemeria* per la verifica dell'origine ibrida degli embrioni (De Benedetti et al., 2000), in Garofano per la selezione assistita di individui resistenti alla senescenza (De Benedetti et al., 2006).

Le ricerche di geni coinvolti in caratteri d'interesse ornamentale e la comprensione della loro funzione è ancora una frontiera per la ricerca biotecnologica italiana sulle piante ornamentali. Le due ricerche principali nel settore riguardano entrambe studi legati alla comprensione della riproduzione vegetativa. Una prima ricerca si è posta l'obiettivo di comprendere gli eventi molecolari precoci che avviano la formazione di plantule dai bordi delle foglie di *Kalanchoe xhoughtonii.* A tal fine sono stati attivati due approcci: a) preparazione e screening di una libreria sottrattiva; b) identificazione di ortologhi di geni omeotici della famiglia *KNOX.* La libreria sottratta (Regis et al., 2006) ha permesso di identificare 270 sequenze differenzialmente espresse successivamente classificate in classi funzionali sulla base delle analogie con sequenze presenti in banca dati. Una delle sequenze identificata con la libreria, codificante un gene BELL like, è stata depositata in banca dati (EU622857). Il sequenziamento di geni *KNOX* ha portato all'identificazione di quattro ortologhi di classe 2 (accession number: EU 272787, EU272788, EU 272789, EU272790) ed uno di classe 1 (accession number: EU240661). Studi di espressione genica hanno permesso di verificare che la sovraespressione del gene *KxhKN5* (classe 1) riduce la taglia delle piante e modifica drasticamente la forma delle foglie: da lanceolate a palmate. La sovraespressione della sequenza parziale di uno dei geni di classe 2 riduce la taglia della pianta ed in alcuni dei cloni transgenici è drasticamente ritardata l'emissione dello scapo fiorale. Una seconda ricerca, nel settore della genomica, ha permesso di identificare e sequenziare parzialmente geni della famiglia *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinase*) di *Cyclamen persicum*: *CpSERK1* e *CpSER* (accession number: EF661828, EF672247, DQ350614). Mediante ibridazione *in situ*, è stata dimostrata l'espressione di *CpSERK1* nelle masse proembriogeniche di *Cyclamen* e negli apici radicali (Savona et al., 2005).

Orticultura

Melanzana. I risultati conseguiti presso il CRA-Unità di Ricerca per l'Orticoltura di Montanaso Lombardo in collaborazioni con altre istituzioni di ricerca nazionali ed estere nell'ambito della pluriennale attività di miglioramento genetico della melanzana (*Solanum melongena*) hanno riguardato l'utilizzazione di tecniche biotecnologiche finalizzate primariamente all'ottenimento di materiale genetico con caratteri innovativi. Tecniche di colture *in vitro* (rigenerazione di piante intere da espianti somatici, cellule in sospensione, microspore, trasformazione genetica, protoplasti e fusione di protoplasti) e molecolari (*fingerprinting* con differenti tipi di marcatori, MAS, e recentemente sviluppo di mappe molecolari, silenziamento genico, genetica funzionale) sono state spesso utilizzate in combinazione nell'ambito dei programmi di breeding rappresentando passaggi indispensabili per il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

La tecnica di trasformazione genetica ha permesso di ingegnerizzare i caratteri di resistenza all'insetto *Leptinotarsa decemlineata* (dorifora) ed il carattere partenocarpia (Arpaia et al., 1997; Rotino et al., 1997). Linee ed ibridi F1 di melanzana esprimenti questi due caratteri sono stati sottoposti ad accurata validazione in pieno campo e/o serra (Acciarri et al., 2000; Donzella et al., 2000; Acciarri et al., 2002; Mennella et al., 2005).

Introgressione della resistenza a *Fusarium oxysporum* e di altri caratteri di utilità agronomica da specie affini è stata ottenuta mediante ibridazione somatica con *S. aethiopicum* e *S. integrifolium*. Gli ibridi somatici tetraploidi hanno mantenuto la resistenza alla fusariosi e mostrato, in generale, tratti fenotipici intermedi o maggiormente simili alla specie affine a melanzana. Allo scopo di incorporare gli ibridi somatici nel programma di miglioramento genetico, la coltura d'antere si è dimostrata essere una tecnica cruciale per ottenere piante androgenetiche diaploidi, quindi potenzialmente incrociabili con la melanzana in quanto hanno il medesimo livello di ploidia. La popolazione di piante diaploidi ha mostrato segregazione di caratteri fenotipici e molecolari (Rizza et al., 2002). Ulteriori indagini, utilizzando marcatori ISSR ed isoenzimi, hanno permesso di evidenziare che almeno parte della variabilità dei diaploidi era generata da effettiva ricombinazione genetica tra i genomi di melanzana coltivata e *S. aethiopicum* (Toppino et al., 2008a). La dimostrazione dell'esistenza di scambi di materiale genetico tra le due specie oltre ad essere un prerequisito per l'introgressione della resistenza a fusariosi nel pool genetico di *S. melongena* ha

evidenziato anche la concreta possibilità che, nelle numerose linee d'introgressione finora sviluppate, possano essere stati introgrediti dalle specie affini anche altri caratteri, riguardanti ad esempio la composizione biochimica del frutto.

Le piante diaploidi resistenti a fusariosi sono state sottoposte a vari cicli (5-6) di reincroci con linee di melanzana possedenti diverse tipologie del frutto; tali progenie da reincrocio successivamente sono state mantenute mediante autofecondazioni. Durante l'allevamento in campo è stata eseguita selezione sia per resistenza a *Fusarium* sia per caratteristiche morfologiche che ha portato all'ottenimento di linee avanzate d'introgressione di pregio con fenotipo simili a quelli dei genotipi ricorrenti. È utile sottolineare che tale materiale genetico ha suscitato l'interesse di alcune ditte sementiere che stanno cofinanziando parte dell'attività di breeding applicato. Il fingerprinting molecolare mediante marcatori ha evidenziato che loci SSR e COSII delle specie affini sono stati stabilmente integrati nel genoma delle linee d'introgressione. Le linee d'introgressione hanno anche permesso di dimostrare che la resistenza a *Fusarium* derivata da *S. aethiopicum* e *S. integrifolium* è controllata da un singolo gene dominante e che i geni delle due specie affini risultano essere allelici. Il locus di resistenza a *Fusarium* è stato denominato *Rfo-sa1*. L'analisi BSA ha permesso d'individuare marcatori molecolari CAPS codominanti associati al locus *Rfo-sa1*, questi marcatori sono utilmente impiegati nella selezione assistita per resistenza a fusariosi (Toppino et al., 2008b). Con lo scopo di eseguire il mappaggio fine del locus *Rfo-sa1* e di migliorare l'efficienza del miglioramento genetico è in corso di costituzione una popolazione di mappa segregante sia per resistenza a *Fusarium* sia per importanti caratteri agronomici e tecnologici. Marcatori molecolari polimorfici anche tra i parentali di mappa (Stagel et al., 2008), attualmente in fase di sviluppo, verranno posizionati nella popolazione segregante per la costruzione di una mappa genetica.

Recentemente sono stati avviate ricerche di genetica funzionale e di proteomica per individuare geni e proteine coinvolti nel meccanismo di resistenza a *Fusarium* (Mennella et al., 2008) e di tolleranza ad un'altra importante micosi vascolare causata da *Verticillium dahliae.*

Frutticoltura

Pesco. Le specie da frutto sono le piante su cui si è maggiormente concentrato l'interesse degli istituti di ricerca italiani che ha prodotto i maggiori progressi degli ultimi anni. Le Rosaceae, con il pesco ed il melo, come vedremo sotto, sono le specie regine nelle quali si è focalizzata l'attività di genomica più avanzata.

Nel pesco, sono state realizzate numerose librerie di sequenze codificanti (cDNA) che sono state utilizzate per produrre sequenze brevi di geni espressi (ESTs) codificate e organizzate in banche dati come quella gestita dal Parco Tecnologico Padano ed altri istituti internazionali (Jung et al., 2008). Presso il CRA di Frutticoltura di Roma, oltre ad aver partecipato alla realizzazione di sequenze EST, sono state realizzate numerose mappe molecolari necessarie per associare tratti fenotipici e regioni del genoma del pesco e di altri *Prunus*. In particolare, proprio questa grande omologia tra le varie specie di questo genere e la loro interfertilità (come ad es. pesco-mandorlo) è possibile interpolare i dati delle analisi dei genomi e realizzare mappe genetiche da incroci interspecifici (Testolin et al., 2000; Dettori et al., 2001; Shulaev et al., 2008). Grazie a questa attività alla quale ha partecipato attivamente l'istituto del CRA sono stati mappati quasi 30 caratteri monogenici o quantitativi. Inoltre si è potuto approfondire lo studio della funzione di diversi geni, su tutti i percorsi metabolici dei composti aromatici nel pesco (Horn et al., 2005).

Le popolazioni di incrocio utilizzate sono una fonte inesauribile di marcatori molecolari (siti specifici ed identificabili sui cromosomi), i quali, una volta correlati con tratti fenotipici specifici, possono essere proposti come strumenti per ridurre i tempi necessari al miglioramento genetico convenzionale per l'ottenimento di nuove cultivar, applicando la selezione assistita da marcatori.

Dalle sopraccitate popolazioni di incrocio sono stati individuati QTLs (Quantitative Trait Loci), loci responsabili di tratti quantitativi responsabili della qualità del frutto e della resistenza a malattie, tra questi: pezzatura frutto, epoca fioritura, diametro del tronco, lunghezza internodi, resistenza oidio, epoca di maturazione, sovracolore della buccia, contenuto solidi solubili.

Strumenti genomici importanti quali uno dei primi microarray a DNA di piante da frutto, contenenti 4.800 geni di pesco (Vecchietti A., personal communication). I microarrays consentono di approfondire lo studio in maniera contemporanea dell'espressione di molti (idealmente tutti) geni confrontando l'espressione genica di tessuti diversi per studiare le specificità di espressione di classi di geni, o anche genotipi diversi in condizioni di crescita diverse o in condizioni diverse quali sotto stress biotico o abiotico.

Melo. La scuola di Bologna ha aperto la strada all'avvento della genomica nelle Rosaceae in Italia, costruendo una rete di rapporti internazionali che è culminata con il risultato più eclatante nell'isolamento e clonaggio del gene per la resistenza alla *Venturia inaequalis* dal *Malus floribunda* (*Vf*) ed il suo inserimento nel background genetico del *Malus domestica* dimostrando il ruolo nella resistenza al patogeno da parte della proteina codificata da questo gene (Belfanti et al., 2004; fig. 1). Si può forse ricondurre a questo successo che ha visto uno dei gruppi italiani più attivi nel miglioramento del melo contribuire in maniera determinante in un tipico progetto di genomica applicata, basandosi sullo sviluppo di mappe e marcatori molecolari, sull'isolamento di una regione cromosomica ben definita, con un arricchimento di marcatori molecolari intorno al gene target e chiusura della regione poi isolata in grandi frammenti di DNA genomico (cloni BAC) contenenti la sequenza codificante il gene *Vf* (Patocchi et al., 1999). La trasformazione genetica in un contesto omologo come il *Malus domestica* ha poi confermato la funzione del gene nel migliore modo possibile, senza dover interpretare il ruolo di questo gene in sistemi modello come l'*Arabidopsis*, metodi estremamente utili ma di minor valore rispetto al confermare l'attività di un gene in una specie appartenente al genere da dove il gene è stato isolato (Belfanti et al., 2004).

Rispetto al pesco, il melo ha avuto apici di un certo successo come quello appena descritto quale risultato di un forte impegno europeo con finanziamenti a progetti di genomica del melo in tre programmi europei consecutivi (http://users.unimi.it/hidras). Queste collaborazioni europee, che hanno visto l'Università di Bologna,

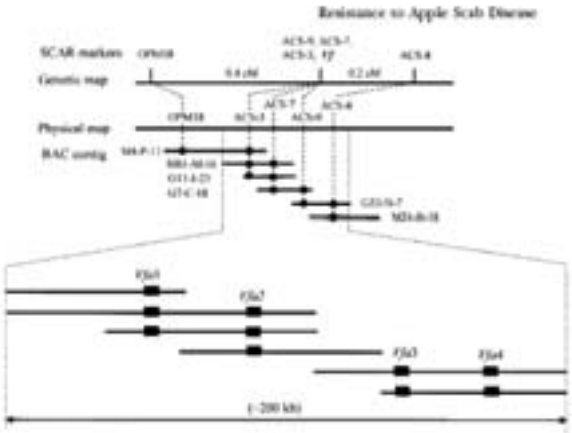

Figura 1. Descrizione della regione fisica contenente il gene Vf per la resistenza alla ticchiolatura in melo (da Xu and Korban 2002, Genetics, 162:1995-2006. Copyright 2002 by the Genetics Society of America).

Figure 1. Description of the physical map of the Vf region, containing the trait of the resistance to apple scab in apple (from Xu and Korban 2002, Genetics, 162:1995-2006. Copyright 2002 by the Genetics Society of America).

ma anche Milano e il CRA di frutticoltura di Roma, partecipi nella crescita di una scuola di genomica delle Rosaceae in Italia. Di fatto, l'attività di genetica molecolare e di genomica del melo ha visto crescere le conoscenze genetiche della specie che ad oggi si possono apprezzare nelle numerose mappe genetiche pubblicate negli ultimi dieci anni, nella mappa fisica (allineamento di cloni BAC; Han et al., 2007) di una varietà di melo coltivata, nelle regioni isolate quali responsabili di tratti monogenici (Erdin et al., 2006) o QTLs (tratti quantitativi) di importanza economica rilevante (Liebhard et al., 2004; Antofie et al., 2007). I tempi erano quindi maturi per il sequenziamento del genoma di questa specie, iniziato dall'Istituto agrario di San Michele all'Adige con il sequenziamento del genoma del varietà Golden delicious e proseguito nell'ambito di una collaborazione internazionale che vede la partecipazione dell'INRA di Angers, dell'Istituto dell'HortResearch neozelandese, dell'Università di Western Cape sudafricana, e dell'Università di Washington State americana. Il progetto è tuttora in corso e si prevede la pubblicazione della sequenza del melo tra la fine dell'anno 2008 e l'inizio del 2009. Tale disponibilità di dati rappresenterà una svolta epocale nel miglioramento genetico della specie e gli strumenti prodotti, quali i marcatori mole-

colari adesso possibili all'interno delle sequenze codificanti predette sulla base della ricostruzione di tutti i 17 cromosomi della specie, sosterranno programmi di miglioramento genetico italiani già di rilevante importanza ma ancora più robusti grazie alle recenti conoscenze prodotte.

Vite. Per ultima, non certo per ordine di importanza, merita un approfondimento la vite in quanto nel corso del 2007 ben due genomi sono stati resi pubblici, da due attività di sequenziamento tra loro complementari, che hanno visto gruppi italiani di Università e Istituti di Ricerca nazionali primeggiare in un settore, la genomica, dove l'Italia aveva finora avuto un ruolo decisamente da comprimaria. Nell'estate del 2007 (Jaillon et al., 2007) un primo lavoro ha presentato un importante contributo a quello che forse può essere descritto come il maggiore progresso dell'anno nelle piante da frutto, con la pubblicazione della sequenza di un genotipo altamente omozigote di *Vitis vinifera*, seguito, nel dicembre del 2007, dalla pubblicazione del secondo lavoro sul genoma del Pinot Nero, sempre della vite europea coltivata (fig. 2; Velasco et al., 2007). Questi due lavori hanno entrambi rivelato la presenza nel genoma della specie di circa 30.000 geni di cui oggi si conosce la posizione sui 19 cromosomi della specie. Nel primo progetto di sequenziamento sono in corso analisi di annotazione fine delle sequenze codificanti attese per la fine dell'anno, nel secondo caso gli oltre 30.000 geni sono stati classificati con sistemi automatici e ci si è concentrati soprattutto nella struttura del genoma di una specie coltivata, altamente eterozigote, e ricca di differenze (polimorfismi) nel confronto tra i due aplotipi (i genomi presenti nei cromosomi omologhi della vite) identificati in oltre 2 milioni di singoli nuclotidi (fig. 3; Troggio et al., 2007; Velasco et al., 2007) e quasi un milione di inserzione e delezioni nel confronto tra i due genomi. Si è visto addirittura come, all'interno di una varietà coesistano due genomi che tra loro differiscono di oltre l'11% in termini di sequenze presente nell'uno ed assenti nell'altro, rivelandoci come nelle differenze esistenti tra due varietà di una specie come la vite, ad esempio il Cabernet Sauvignon e il Pinot Nero esistano porzioni del genoma che sono completamente assenti in una varietà e presenti nell'altra (Zharkikh et al., 2008). Queste differenze

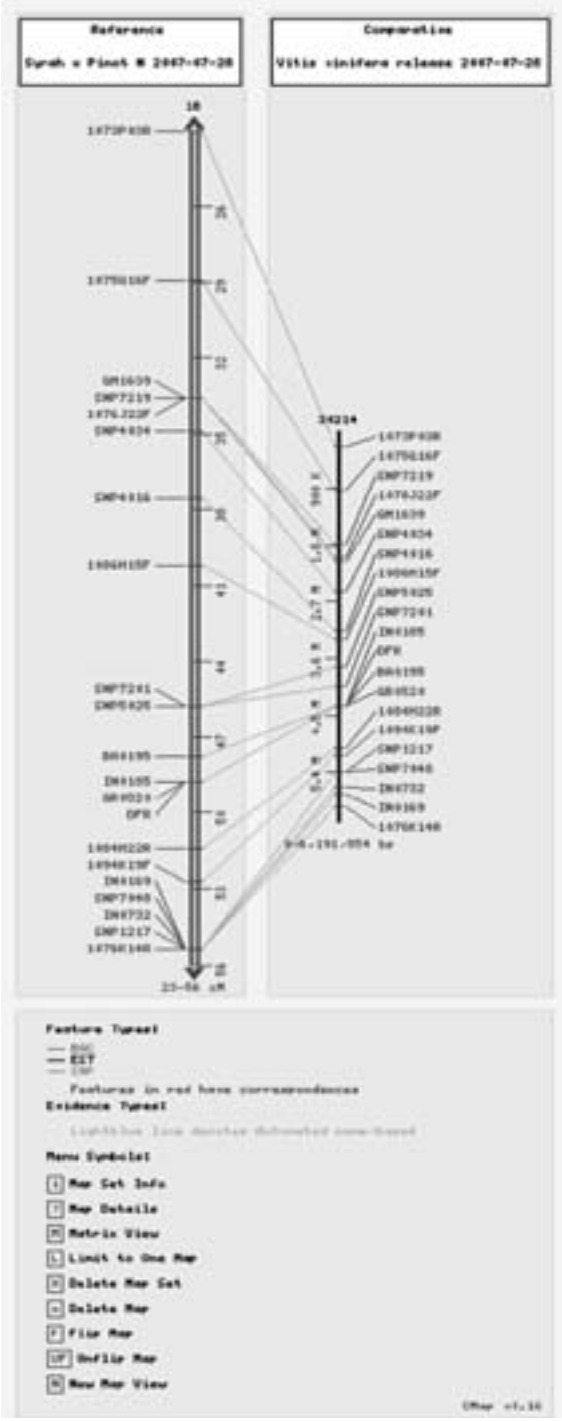

Figura 2. Comparazione tra mappa genetica e sequenza genomica nel cromosoma 18 (http://genomics.research.iasma.it, da Zharkikh et al., 2008. Copyright 2008 by the Journal of Biotecnology).

Figure 2. Comparison between the genetic map and the genome sequenze on chromosome 18 (http://genomics.research.iasma.it, from Zharkikh et al., 2008. Copyright 2008 by the Journal of Biotecnology).

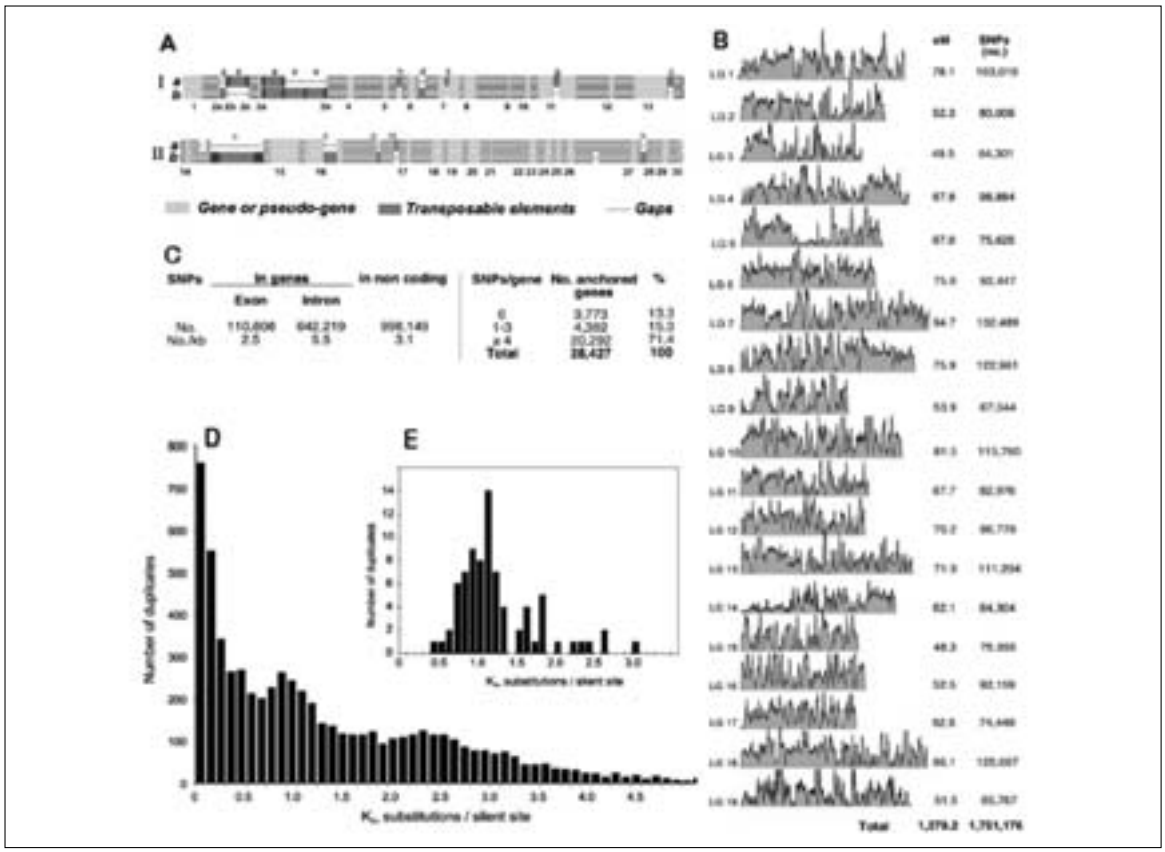

Figura 3. Particolari del genoma del Pinot Nero. A) differenze tra i due aplotipi nei due cromosomi omologhi del Pinot; B) rappresentazione grafica della distribuzione dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) tra i due aplotipi e numero di SNPs totale per cromosoma; C) numero SNPs in esoni, introni, sequenze intergeneiche; distribuzione degli SNPs nelle sequenze codificanti; D ed E) analisi delle sostituzioni aminoacidiche utilizzate per studi filogenetici. (da Velasco et al., 2007. Copyright 2007 by PLoSONE, 2, 12:e1326).

Figure 3. Details of the Pinot Noir genome: A) differences between the two haplotypes of the two homologues chromosomes in Pinot; B) graphic representation of the polymorphism distribution of single nucleotides (SNPs) between the two haplotypes and total number of SNPs per chromosome; C) number of SNPs in exons, introns and intergenic sequences; distribution of SNPs in the coding sequences; D and E) analysis of the aminoacidic substitutions used for phylogenetic analysis (from Velasco et al., 2007. Copyright 2007 by PLoSONE, 2, 12:e1326).

possono chiaramente giocare ruoli fondamentali nelle diverse caratteristiche vinificatorie delle due varietà ed aiutare enormemente nel futuro del miglioramento genetico (Troggio et al., 2008).

A questo proposito vale forse la pena sottolineare che nel settore viticolo non abbiamo richieste di rinnovo varietale come per esempio nel settore della mela o delle drupacee. Questo anche per l'utilizzo del prodotto uva non tanto nel consumo diretto quanto nella produzione di lavorato (vino) che subisce notevoli trasformazioni che, si pensa, abbiano maggiore importanza del prodotto uva. È però un fatto che solo da buona uva si può produrre buon vino, e che a conti fatti, le varietà di maggiore diffusione mondiale si contano sulla punta delle dita, e che queste vengano utilizzate spesso per migliorare o stabilizzare il prodotto lavorato di varietà meno stabili o più scadenti (ENOSIS, 2007). Alla luce di ciò, presentare un programma di miglioramento genetico e di costituzione di nuove varietà utilizzando l'enorme mole di dati che il sequenziamento del genoma della vite ha prodotto si ritiene che possa essere una proposta che avrà esiti rivoluzionari anche nel campo della viticoltura.

Un discorso a parte merita quanto può es-

sere fatto nel campo del miglioramento genetico dell'uva da tavola, che è da sempre in mano a Stati Uniti o Israele, gli unici stati che hanno investito seriamente in questa attività che li vede dominare la scena. La viticoltura italiana può riprendersi un ruolo importante nel settore di costituzione di nuove varietà se saprà utilizzare la mole di dati e competenze che si sono sviluppate grazie anche e soprattutto a queste due iniziative di elevato profilo che hanno definitivamente sancito il ruolo di centri di genomica e genetica vegetale italiani nel panorama internazionale.

Conclusioni

Gli esempi riportati ci danno un'idea di quella che è stata l'evoluzione della ricerca nel settore orto-floro-frutticolo italiano. Il panorama è tutt'altro che deserto dal punto di vista delle idee e delle competenze. Anzi, quando adeguatamente finanziato, ha dimostrato che anche in Italia si può realizzare un'ottima ricerca che darà frutti importanti nel settore del miglioramento genetico dei prossimi anni. La crescita di giovani motivati e competenti è forse il risultato migliore. Questi progetti hanno contribuito fortemente alla loro crescita e alla loro produttività scientifica.

È evidente che il settore orto-floro-frutticolo rappresenti una parte importante dell'agricoltura italiana, e che possa divenirne il fiore all'occhiello, anche perché, a causa degli sviluppi del mercato globale, potremo vedere un ruolo importante per l'Italia solo se i suoi prodotti saranno sempre chiaramente distinguibili per qualità e tracciabilità, più che per l'elevata produzione. In quest'ottica, la ricerca italiana nel settore può e deve giocare un ruolo determinante nel contribuire al miglioramento degli aspetti qualitativi dei prodotti ad alto valore nutritivo quali ortaggi e frutta, ed a proporre novità caratterizzanti il nostro panorama varietale con novità commercialmente apprezzabili.

Bibliografia

Floricoltura

Bertoli A.A., Giovannini A., Ruffoni B., Di Guardo A., Spinelli G., Mazzetti M., Pistelli L. 2008. Bioactive constituent production in St. John's Wort in vitro hairy roots – regenerated plant lines. J. Agriculture and Food Chemistry, 56, 13:5078-82.

Bruna S., Burchi G., De Benedetti L., Mercuri A., Pecchioni N., Bianchini C., Schiva T. 2005. Molecular analysis of *Limonium* genus through RAPD markers. Agricoltura Mediterranea, 135:52-58.

Bruna S., Portis E., Cervelli C., De Benedetti L., Schiva T., Mercuri A. 2007. AFLP-based genetic relationships in the Mediterranean myrtle (*Myrtus communis* L.). Scientia Horticulturae, 113:370-375.

Bruna S., Braglia L., Lanteri S., Mercuri A., Portis E. 2008. An AFLP-based assessment of the genetic diversity within *Hibiscus rosa sinensis* and the place of the species within the genus *Hibiscus*. Accepted by Conserv. Genet., in press.

De Benedetti L., Burchi G., Mercuri A., Pecchioni N., Faccioli P., Schiva T. 2000. Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) analysis for the verification of hybridity in interspecifc crosses of Alstroemeria. Plant Breeding, 119:443-44.

De Benedetti L., Bruna S., Mercuri A., Burchi G., Pecchioni N., Bianchini C., Schiva T. 2006. Impiego di marcatori molecolari in garofano e loro applicazione per il miglioramento della qualità post-raccolta. Italus Hortus, 13,5:141-1455.

Esposito S., Colucci M.G., Frusciante L., Filippine E., Lorito M., Bressan R.A. 2000. Antifungal transgene expression in *Petunia hybrida*. Acta Hort., 508:157-162.

Faccioli P., Secchioni N., Berio T., Giovannini A., Allavena A. 2000. Genetic diversity in cultivated *Osteospermum* as revealed by RAPDS analysis. Plant Breeding, 119:351-355.

Giovannini A., Zottini M., Spena A., Allavena A. 1999. Ornamental traits modification by *rol* genes in *Osteospermum ecklonis* transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant., 35:70-75.

Laura M., Safaverdi G., Allavena A. 2006a. Androgenetic plants of *Anemone coronaria* derived through anther culture. Plant Breeding, 125, 6:629-634.

Laura M., Allavena A., Magurno F., Lanteri S., Portis E. 2006b. Genetic variation of commercial *Anemone coronaria* cultivars assessed by AFLP. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 81, 4:621-626.

Mercuri A., Bruna S., De Benedetti L., Burchi G., Schiva T. 2001. Modification of plant architecture in Limonium spp. induced by rol genes. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 65, 3:247-253

Mercuri A., Sacchetti A., De Benedetti L., Schiva T., Alberti S. 2001. Green fluorescent flowers. Plant Science, 161, 5:961-968.

Portis E., Comino C., Lanteri S., Lenzi A., Lombardi P., Tesi R. 2004. Genetic Relationships between Oleander (*Nerium oleander* L.) Accessions by Means of AFLP Profiling. Acta Hort, 651:173-180.

Regis C., Laura M., Morreale G., Vale' G., Allavena A. 2006. Screening of viviparous plantlet formation-related genes in *Kalanchoe daigremontiana* by SSH analysis. Acta Horticulture, 714:155-161.

Savona M., Ruffoni B., Giovannini C., Albrecht C., De Vries S., Altamura M.M. 2005. Il gene SERK1 (Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1) in colture di callo con alta potenzialità embriogenica di *Cyclamen persicum* Mill cv "Halios". Informatore Botanico Italiano, 37, 1 B:736-737.

Scariot V., Akak A., Botta R. 2006. Characterization and genetic relationship of wild species and old garden roses based on microsatellite analysis. J. Am. Soc. Hort. Sci., 131, 1:66-73.

Scariot V., De Keyser E., Handa T., de Riek J. 2007. Comparative study of the discriminating capacity and effectiveness of AFLP, STMS and EST markers in assessing genetic relationships among evergreen Azalea. Plant Breeding, 126:207-212.

Varia A.M., Berio T., Accotto G.P., Vecchiati M., Allavena A. 2000. Evaluation of resistance in *Osteospermum ecklonis* (DC) Norl. plants transgenic for the N protein gene of tomato spotted wilt virus. Plant Cell Report, 19, 10:983-988.

Orticultura

Acciarri N., Vitelli G., Arpaia S., Mennella G., Sunseri F., Rotino G.L. 2000. Transgenic resistance to the Colorado Potato Beetle in Bt-expressing eggplant fields. HortScience, 35, 4:722-725.

Acciarri N., Restaino F., Vitelli G., Perrone D., Zottini M., Pandolfini T., Spena A., Rotino G.L. 2002. Genetically modified parthenocarpic eggplants: improved fruit productivity under both greenhouse and open field cultivation. BMC Biotechnology, 2:4.

Arpaia S., Mennella G., Onofaro V., Perri E., Sunseri F., Rotino G.L. 1997. Production of transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) resistant to Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). Theoretical Applied Genetics, 95:329-334.

Donzella G., Spena A., Rotino G.L. 2000. Transgenic parthenocarpic eggplants: superior germplasm for increased winter production. Molecular Breeding, 6:79-86.

Mennella G., Acciarri N., D'alessandro A., Perrone D., Arpaia S., Sunseri F., Rotino G.L. 2005. Mixed deployment of Bt-expressing eggplant hybrids as a reliable method to manage resistance to Colorado potato beetle. Scientia Horticulturae, 104:127-135.

Mennella G., Francese G., D'alessandro A., Toppino L., Cavallanti F., Sparpaglione M., Sabatini E., Vale' G., Acciarri N., Rotino G.L. 2008. Proteins and genes involved in the *Fusarium oxysporum* f.s. *melongenae* resistance mechanism in new eggplant introgressed breeding lines. Proceedings 52nd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, 14-17 September 2008, Padova, Italy. Poster Abstract – c. 14.

Rizza F., Mennella G., Collonnier C., Sihachakr D., Kashyap V., Rajam M.V., Presterà M., Rotino G.L. 2002. Androgenetic dihaploids from somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. aethiopicum* group *gilo* as a source of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melongenae.* Plant Cell Report, 20:1022-1032.

Rotino G.L., Perri E., Zottini M., Sommer H., Spena A. 1997. Genetic engineering of parthenocarpic plants. Nature Biotechnology, 15:1398-1401.

Stagel A., Portis E., Toppino L., Rotino G.L., Lanteri S. 2008. Gene-based microsatellite development for mapping and phylogeny studies in eggplant. BMC Genomics, 9:357.

Toppino L., Mennella G., Rizza F., D'alessandro A., Sihachakr D., Rotino G.L. 2008a. ISSR and Isozyme Characterization of androgenetic dihaploids reveals tetrasomic inheritance in tetraploid somatic hybrids between *Solanum melongena* and *Solanum aethiopicum* group *gilo*. Journal of Heredity, 99, 1:304-315.

Toppino L., Vale' G., Rotino G.L. 2008b. Inheritance of *Fusarium* wilt resistance introgfressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and *Aculeatum* groups into cultivated eggplant (*S. melongena*) and development of assiciated PCR-based markers. Molecular Breeding, in press.

Frutticoltura

Antofie A., Lateur M., Oger R., Patocchi A., Durel C.E., Van de Weg W.E. 2007. A new versatile database created for geneticists and breeders to link molecular and phenotypic data in perennial crops: the *Apple Breed DataBase*. Bioinformatics, 23, 7:882-891.

Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S., Patocchi A., Barbieri M., Zhu J., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Gessler C., Sansavini S. 2004. The HcrVf2 gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 3:886-890.

Dettori M.T., Quarta R., Verde I. 2001. A peach linkage map integrating RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers. Genome, 44, 5:783-790.

Erdin N., Tartarini S., Broggini G.A., Gennari F., Sansavini S., Gessler C., Patocchi A. 2006. Mapping of the apple scab-resistance gene Vb. Genome, 49, 10:1238-1245.

Han Y., Gasic K., Marron B., Beever J.E., Korban S.S. 2007. A BAC-based physical map of the apple genome. Genomics, 89, 5:630-637.

Horn R., Lecouls A.C., Callahan A., Dandekar A., Garay L., McCord P., Howad W., Chan H., Verde I., Main D., Jung S., Georgi L., Forrest S., Mook J., Zhebentyayeva T., Yu Y., Kim H.R., Jesudurai C., Sosinski B., Arús P., Baird V., Parfitt D., Reighard G., Scorza R., Tomkins J., Wing R., Abbott A.G. 2005. Candidate gene database and transcript map for peach, a model species for fruit trees. Theor. Appl. Genet., 110, 8:1419-28.

Jaillon O. et al. 2007. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. Nature, 449:463-467.

Jung S., Staton M., Lee T., Blenda A., Svancara R., Abbott A., Main D. 2008. GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. Nucleic Acids Res., 36, Database issue:D1034-1040.

Liebhard R., Kellerhals M., Pfammatter W., Jertmini M., Gessler C. 2003. Mapping quantitative physiological traits in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Plant Mol. Biol., 52, 3:511-26.

Patocchi A., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.B., Sansavini S., Gessler C. 1999. Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple scab resistance gene Vf. Mol. Gen. Genet., 262, 4-5:884-91.

Shulaev V., Korban S.S., Sosinski B., Abbott A.G., Aldwinckle H.S., Folta K.M., Iezzoni A., Main D., Arús P., Dandekar A.M., Lewers K., Brown S.K., Davis T.M., Gardiner S.E., Potter D., Veilleux R.E. 2008. Multiple models for Rosaceae genomics. Plant Physiol., 147, 3:985-1003.

Testolin R., Marrazzo T., Cipriani G., Quarta R., Verde I., Dettori M.T., Pancaldi M., Sansavini S. 2000. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica* L. Batsch) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome, 43, 3:512-520.

Troggio M., Malacarne G., Coppola G., Segala C., Cartwright D., Pindo M., Stefanini M., Mank R., Moroldo M., Morgante M., Grando M.S., Velasco R. 2007. A physically anchored SNP-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.). Genetics, 176, 4:2637-50.

Troggio M., Vezzulli S., Pindo M., Malacarne G., Fontana P., Moreira F.M., Costantini L., Grando M.S., Viola R., Velasco R. 2008. Beyond the Genome, Opportunities for a Modern Viticulture: A Research Overview. Am. J. Vit. Enol., 59:2-11.

Velasco R., Zharkikh A., Troggio M., Cartwright D.A., Cestaro A., Pruss D., Pindo M., FitzGerald L.M., Vezzulli S., Reid J., Malacarne G., Iliev D., Coppola G., Wardell B., Micheletti D., Macalma T., Facci M., Mitchell J.T., Perazzolli M., Eldredge G., Gatto P., Oyzerski R., Moretto M., Gutin N., Stefanini M., Chen Y., Segala C., Davenport C., Demattè L., Mraz A., Battilana J., Stormo K., Costa F., Tao Q., Si-Ammour A., Harkins T., Lackey A., Perbost C., Taillon B., Stella A., Soloviev V., Fawcett J.A., Sterck L., Grando M.S., Toppo S., Moser C., Lanchbury J., Bogden R., Skolnick M., Sgaramella V., Bhatnagar S.K., Fontana P., Gutin A., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. PLoSONE, 2, 12:e1326.

Zharkikh A., Troggio M., Pruss D., Pindo M., Eldrdge G., Cestaro A., Mitchell J.T., Vezzulli S., Bhatnagar S., Fontana P., Viola R., Gutin A., Salamini F., Skolnick M., Velasco R. 2008. Sequencing and Assembly of Highly Heterozygous Genome of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir: Problems and Solutions. J. Biotech., 136:38-43.