Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
125° (2007), Vol. XXXI, P. II, t. I, pp. 179-187

G. SCARASCIA MUGNOZZA *,** – A. BATTISTELLI * – M. GAUDET *
M. SABATTI * – P. PARIS *

Incremento di produttività ed ecocompatibilità delle biorisorse vegetali: il ruolo delle biotecnologie

Riassunto – L'Unione Europea si è impegnata a sostituire, entro il 2020, il 20% del consumo di combustibili fossili con risorse rinnovabili per poter abbattere del 20% le emissioni di gas serra; questi obiettivi saranno raggiungibili solo grazie ad un rilevante impegno in ricerca e sviluppo tecnologico. Questo è ancor più vero per l'Italia che, dovendo privilegiare la sostenibilità socio-economica e ambientale delle colture da biomassa, avrà la necessità di organizzare la produzione e l'uso dei materiali d'origine vegetale per usi industriali, in stretto collegamento fra esigenze degli utilizzatori e le capacità dei produttori, in filiere agro-industriali corte con solida base territoriale e alti apporti tecnologici, di ricerca e innovazione.

Abstract – The growing demands for the production of biofuels and bio-materials has prompted a worldwide interest in identifying new potential uses of crops and trees as sources of raw feedstock for the chemical industry. The forecast for the biomass utilisation in industrial processes predicts an increasing demand which in a large proportion should be produced by dedicated systems, such as forest plantations and agroforestry systems, and with the highest possible commitment to economical, social and environmental sustainability. There is then a large potential for genetic amelioration of trees, with traditional and modern methods, taking into account the specific needs of different and alternative utilisations. The industry should be able to cooperate with the plant biology sector to produce specific and dedicated demands of research in order to have tailor made lignocellulosic material for the diverse cultivation sites and final destinations.

Parole chiave: Biomasse, piantagioni forestali a turni brevi, genomica funzionale, bio-energia, bio-raffinerie, *Populus*.

* Istituto di Biologia Agro-ambientale e Forestale del CNR, 05010 Porano (TR)
** DISAFRI, Università della Tuscia, 01100 Viterbo. E-mail: giuseppe.scarascia@ibaf.cnr.it

Introduzione

Il Dipartimento per l'Energia americano ha indicato come obiettivo per il 2025 la sostituzione del 30% dei combustibili liquidi derivati dal petrolio per il trasporto con bio-carburanti e del 25% dei composti organici di origine petrolifera utilizzati nell'industria con composti derivati da biomasse, (Ragauskas *et al.*, 2006). L'Unione Europea, con la direttiva 2003/30/EC («the Biofuel Directive») ha posto l'obbiettivo di sostituire entro il 2010 il 5,75 % di tutti i carburanti per il trasporto con prodotti derivati da biomasse; ancora più recentemente, per affrontare l'emergenza dettata dal rischio dei cambiamenti climatici, la UE si è impegnata a sostituire, entro il 2020, il 20% del consumo di combustibili fossili con risorse rinnovabili per poter abbattere del 20% le emissioni di gas serra. È evidente che questi obiettivi saranno raggiungibili solo grazie ad un rilevante impegno in ricerca e sviluppo tecnologico. Per l'Italia è necessario, dal punto di vista della sostenibilità socio-economica e ambientale di un Paese tipicamente mediterraneo, che la produzione e l'uso dei materiali d'origine vegetale per usi industriali siano organizzati con uno stretto collegamento fra esigenze degli utilizzatori e capacità dei produttori in filiere agro-industriali corte, con solida base territoriale, e alti apporti tecnologici, di ricerca e innovazione.

Trasformazione delle biomasse

Oltre alla trasformazione energetica, l'impiego di biomasse si dovrà espandere anche ai diversi comparti industriali affinché si possa disporre di materie prime realmente rinnovabili, destinate alle più svariate catene manifatturiere per prodotti finiti; è questo il vero snodo da affrontare se si vuole concretamente imboccare la via verso una società e una economia realmente sostenibili, basate sulle bio-risorse. Tra le diverse, possibili destinazioni industriali del materiale ligno-cellulosico (MLC) vi è l'impiego di MLC come componente di materiali compositi, ad esempio previa funzionalizzazione chimica mediata da attacco delle laccasi. Le laccasi agiscono sui gruppi ossidrile dei fenoli della lignina. La lignina e anche la cellulosa e le emicellulose costituiscono frazioni variabili della parete cellulare. Le loro vie biosintetiche sono strettamente connesse a livello metabolico in relazione alla disponibilità e allocazione dei fotoassimilati; per questo i fattori ambientali e colturali che incidano ad esempio sulla velocità di crescita e sull'attività del cambio – come lo stato nutrizionale della pianta, la carenza idrica, le temperature di crescita, l'orientamento del fusto, la densità dei popolamenti – oltre a quelli genetici, possono modificare i rapporti quantitativi tra le diverse componenti, le loro caratteristiche chimiche e il loro grado di associazione alterando di conseguenza le caratteristiche chimiche e tecnologiche del MLC. Negli ultimi anni si è assistito ad un notevole sviluppo di ricerche mirate a individuare e controllare i fattori genetici e fisiologici che regolano i parametri quantitativi e qualitativi della produzione di

materiale ligno-cellulosico (Scarascia-Mugnozza *et al.*, 2007). In Italia esistono ampie possibilità di produrre MLC in specifici contesti pedoclimatici. Nelle zone fertili pianeggianti, nuovi ibridi di pioppo (*Populus* spp.) hanno prodotto sino a 25 t ha^{-1} $anno^{-1}$ di biomassa secca (Mareschi *et al.*, 2005), con *input* colturali (fertilizzanti, irrigazione e pesticidi) più bassi rispetto alle colture agrarie più produttive (mais, ad esempio). Nelle zone marginali, specie rustiche come la robinia (*Robinia pseudocacia*) (Paris *et al.*, 2006), il miscanto (*Miscanthus* spp.) e la canna comune (*Arundo donax* L.) potrebbero produrre biomassa ligno-cellulosica, su terreni dismessi da usi agricoli. Inoltre, residui colturali, come le potature delle viti (sino a 2 t h ha^{-1} $anno^{-1}$ di biomassa fresca), potrebbero essere valorizzati come fonte di MLC per processi energetici ed industriali di filiere locali. In letteratura non esistono dati sufficienti in merito alla caratterizzazione qualitativa del MLC in funzione dell'attacco delle laccasi o altre trasformazioni bio-enzimatiche per la successiva funzionalizzazione. Questo costituisce un ulteriore impedimento alla costruzione di una filiera agro-industriale che permetta di implementare, sulla base del concetto di *tailor-made*, la stretta integrazione tra produzione agro-forestale ed utilizzazione industriale di un MLC particolarmente adatto a questo specifico uso, che vari ambienti mediterranei italiani possono potenzialmente produrre.

Selezione genetica con tecniche innovative

La conversione dell'energia solare in energia chimica disponibile nella biomassa vegetale è un processo con limitata efficienza; la ricerca biologica e agroforestale può aumentare sensibilmente la produttività delle colture da biomasse ligno-cellulosiche e ne può inoltre migliorare le caratteristiche qualitative in funzione delle esigenze specifiche degli utilizzatori. In particolare, le piante arboree da legno, così come alcune nuove colture vegetali, potenzialmente interessanti per biomasse ed energia, sono state oggetto di una ridotta attività di studio rispetto alle tradizionali piante agricole, e per questo si ritiene che esistano ancora margini ampi per aumentare la produttività delle piante e delle colture da legno (Bradshaw *et al.*, 2000). Queste potenzialità vanno esaltate con un particolare riguardo all'efficienza produttiva, all'efficiente uso delle risorse naturali quali acqua e luce e degli *inputs* agronomici. Sarà compito della ricerca anche quello di assicurare il mantenimento della fertilità del suolo e di favorire lo sviluppo della biodiversità. Definire modelli colturali produttivi, pienamente sostenibili dal punto di vista ambientale adatti a un potenziale bacino di rifornimento della materia prima per i processi di bioraffinazione, permetterebbe di assicurare l'integrazione della filiera con il tessuto agricolo del territorio, cosi da garantire un'ampia partecipazione sociale e territoriale alle attività della filiera.

Un esempio interessante di integrazione tra ricerca fondamentale sui caratteri funzionali e genetici in alberi forestali e le applicazioni ai fini colturali per la produzione di biomassa o il miglioramento dell'adattamento ai fattori ambientali è

offerto dagli studi di genetica e fisiologia condotti sul gen. *Populus*. Infatti, il pioppo è ormai universalmente considerato una pianta modello per la ricerca sulla genetica degli alberi forestali (Taylor 2002); per molte specie di pioppo sono state ottenute e pubblicate delle mappe genetiche, principalmente basate su incroci interspecifici. Anche gli studi sul genoma, di dimensioni abbastanza contenute di circa 520 Mb, sono molto avanzati e *Populus trichocarpa* è la prima specie forestale il cui genoma è stato completamente sequenziato. Il pioppo nero (*Populus nigra* L.) è una delle principali specie degli ecosistemi riparali europei, ma il suo habitat naturale è stato fortemente ridotto dalle attività antropiche. Questa specie risulta quindi di interesse, ecologico e si rende necessario preservare le popolazioni naturali residue, perché queste rappresentano importanti riserve di germoplasma a cui attingere per il ripristino degli ecosistemi riparali. Il pioppo nero riveste anche un interesse economico perché esso svolge un ruolo centrale per la produzione di ibridi commerciali interspecifici di grande diffusione. In questo contesto, una mappa genetica può costituire uno strumento utile da molti punti di vista. Per un approccio ecologico una mappa può fornire un *set* di marcatori rappresentativi dell'intero genoma, utili per lo studio della diversità genetica delle popolazioni naturali. Per obiettivi economici, una mappa genetica può servire alla ricerca di marcatori genetici associati a caratteri di interesse, utilizzabili in programmi di selezione assistita da marcatori. Infine da un punto di vista scientifico, una mappa genetica fornisce una migliore comprensione della struttura e dell'evoluzione del genoma.

Progetti di ricerca avanzata a scala europea sono stati organizzati per valutare e comprendere l'importanza di alcuni caratteri quantitativi coinvolti nella produzione di biomassa in specie autoctone di pioppo, in particolare pioppo bianco (*P. alba*) e pioppo nero (*P. nigra*). Tale attività di ricerca si integra con studi nel settore della biologia molecolare per individuare marcatori genetici coinvolti nell'espressione dei caratteri esaminati (Gaudet *et al.*, 2007), attraverso un'analisi QTL (Quantitative Trait Loci), da utilizzare per il miglioramento genetico e lo sviluppo della selezione assistita da marcatori molecolari (MAS).

Gli obiettivi e le fasi principali di questi progetti possono essere così sintetizzati:

1. Produzione di materiale genetico e sviluppo di una rete sperimentale europea per il genoma e la genetica molecolare del pioppo;
2. Individuazione dei caratteri fisiologici legati alla produzione;
3. Individuazione dei caratteri che inducono la resistenza alle malattie;
4. Individuazione dei QTL e sviluppo di una mappa genetica di marcatori molecolari del pioppo;
5. Identificazione e mappatura dei geni candidati.

Genomica di colture forestali per biomassa

I recenti progressi nel campo della genomica strutturale, funzionale e comparativa indirizzano la biologia delle piante verso una nuova era. Gli alberi forestali

sono gli organismi dominanti in molti ecosistemi; l'importanza della conoscenza della loro biologia, anche attraverso la valutazione della loro plasticità adattativa, in risposta a stimoli ambientali diversi, e la comprensione dei meccanismi che regolano questa plasticità, è legata a considerazioni di carattere sia ecologico che economico. Le foreste del pianeta, sia quelle antropizzate sia quelle naturali, svolgono funzioni importanti per la sopravvivenza della specie umana ed in generale per tutti gli esseri viventi. Alle piante, e alle specie arboree in particolare, si deve infatti una moltitudine di effetti benefici sulla qualità dell'ambiente grazie alla loro capacità di fissare il carbonio presente in atmosfera, al loro possibile utilizzo come fonte di energia rinnovabile, alle funzioni che svolgono per la regimazione delle acque e per migliorare la qualità dell'aria e alla riserva di biodiversità contenuta negli ecosistemi forestali. Tuttavia, nonostante la evidente importanza delle specie forestali arboree per la salvaguardia dell'ambiente e per il sistema economico, le informazioni sulla loro biologia sono ancora scarse in confronto, per esempio, a quelle disponibili per le specie erbacee coltivate, ottenute grazie soprattutto a studi condotti su specie modello, come *Arabidopsis thaliana* (Taylor 2002). Nella comunità scientifica forestale è sempre più sentita, da qualche anno a questa parte, l'esigenza di disporre di un sistema modello per lo studio delle piante arboree, sul quale indagare la biologia propria degli alberi e legata alla loro struttura complessa, in relazione al lungo ciclo vitale che li contraddistingue. Le varie specie del genere *Populus* hanno caratteristiche comuni tali da rendere questo genere interessante dal punto di vista di un suo utilizzo come sistema modello di pianta arborea, per studi finalizzati all'ottenimento di informazioni estendibili ad altre specie arboree. Esistono diversi *pedigree* di pioppo, comprendenti anche più generazioni, studiati da diversi autori, mediante i quali si cerca di individuare, con analisi di segregazione dei caratteri e dei marcatori molecolari utilizzati, le relazioni tra marcatori e caratteri *target* (Fig. 1). Lo scopo è rendere più rapido il processo di individuazione dei genotipi potenzialmente interessanti, per l'uno o l'altro dei caratteri studiati, mediante semplice selezione per marcatori basata su analisi molecolare sul DNA degli individui. Queste analisi consentono di accorciare sostanzialmente i tempi propri delle prove di valutazione tradizionali, legate ai tempi di sviluppo delle piante. La conoscenza del germoplasma autoctono è una condizione indispensabile per poter elaborare strategie di conservazione e salvaguardia ambientale (Sabatti *et al.*, 2000). Interventi di riforestazione, di recupero di ambienti marginali e degradati, di realizzazione di impianti con il duplice intento di sfruttare la capacità delle piante arboree di stoccare CO_2 atmosferica e produrre materiale legnoso da impiegare come fonte di bioenergia, limitando l'uso di combustibili fossili, richiedono conoscenze di base sulle caratteristiche di plasticità del materiale vegetale da utilizzare, in considerazione anche della grande varietà di ambienti che contraddistingue il territorio della nostra nazione. Le attività di ricerca presso l'Università della Tuscia e il CNR-IBAF si sono concentrate sui seguenti aspetti: la costruzione di una mappa genetica del pioppo nero ricca di marcatori SSR e uno studio comparativo delle mappe di differenti specie di pioppo (Gaudet *et al.*, 2007).

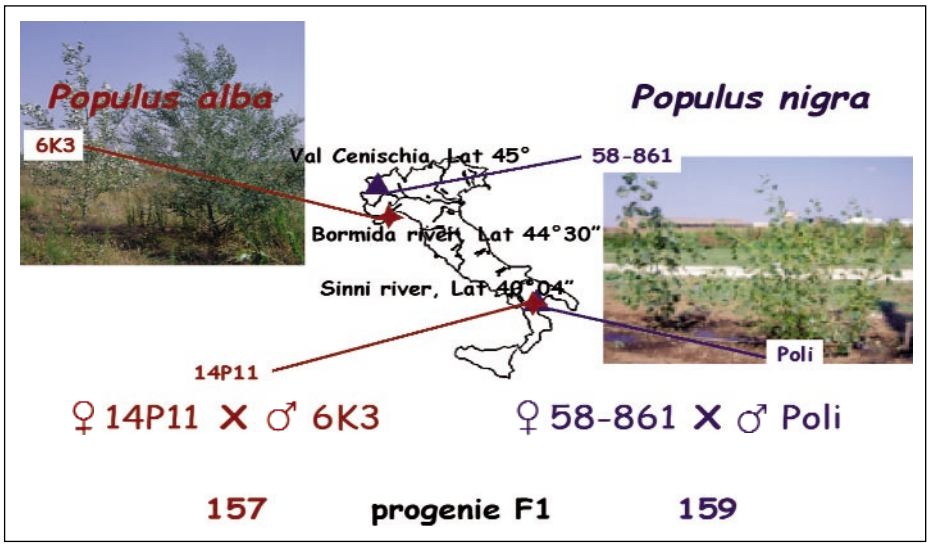

Fig. 1. Realizzazione di *pedigrees* da popolazioni naturali di specie di pioppi spontanei del bacino Mediterraneo.

La costruzione della mappa si è sviluppata attraverso 3 fasi: i) ottenimento di una progenie segregante; ii) analisi della progenie mediante marcatori genetici; iii) analisi statistica dei dati di segregazione. Per l'ottenimento di una progenie segregante è stato realizzato un incrocio intraspecifico controllato tra due genotipi di pioppo nero selezionati da ambienti naturali contrastanti in termini di latitudine e di clima. Il genotipo femminile è stato raccolto in val Cenischia in Piemonte (coordinate 45°N, 7°E), nelle Alpi ad un altitudine di 597 m s.l.m.. Il genotipo maschile è stato raccolto a Policoro in Basilicata, (coordinate 40°N, 16°E) a poca distanza dal mare, ad un altitudine di 7 m. s.l.m.. In esperimenti *common garden* i due genotipi parentali hanno mostrato caratteristiche fenotipiche divergenti, in particolare per l'architettura della chioma, la morfologia fogliare e la fenologia. Gli incroci intraspecifici sono poco utilizzati per mappe genetiche in specie forestali, tuttavia, la grande divergenza genetica tra i due genitori selezionati ha prodotto una grande variabilità sia dei caratteri quantitativi, sia a livello molecolare. Per la costruzione della mappa genetica sono stati utilizzati 330 marcatori SSRs, 40 combinazioni di primers AFLP e 7 marcatori SNPs. Quattro dei 7 SNPs analizzati corrispondono ai geni *PhyA*, *PhyB1*, *PhyB2*, and *IAA*. 92 individui F1 sono stati analizzati con i marcatori selezionati per determinare il genotipo corrispondente ad ogni marcatore. I dati di segregazione ottenuti dall'analisi della progenie F1 sono stati usati per la costruzione della mappa genetica seguendo la strategia «double pseudo-test cross». Essa consiste nel seguire separatamente la segregazione degli alleli di ciascun genitore. Si ottengono così due *set* di dati ed, infine, due mappe genetiche, una per il

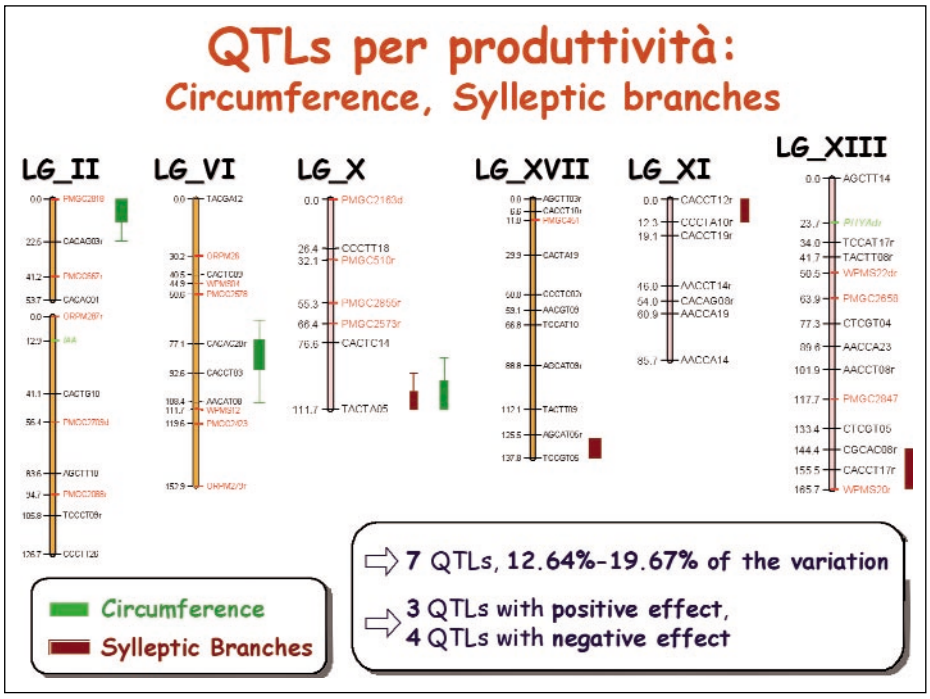

Fig. 2. Localizzazione di caratteri quantitativi (QTL) legati alla produttività, sulla mappa genetica di *Populus nigra*.

parentale femminile ed una per il parentale maschile. La corretta segregazione mendeliana dei marcatori è stata verificata con un test χ^2. La percentuale osservata di marcatori distorti è di 10,77% per il parentale femminile e 14,94% per il parentale femminile, tale differenza non è statisticamente significativa (test χ^2 $p < 0,05$). Il software Mapmaker 3.0 è stato utilizzato per l'analisi di associazione e la costruzione dei gruppi. Una soglia di LOD = 4,0 e un tasso di ricombinazione massimo $\theta = 0,3$ (corrispondente a una distanza massima di Kosambi di 34,7 cM) sono stati applicati per la ricerca dei marcatori associati. All'interno di ciascun gruppo i marcatori sono stati ordinati utilizzando una procedura di massimizzazione della probabilità (*maximum likelihood*) e le distanze tra marcatori sono state stimate utilizzando la funzione di Kosambi.

In totale 368 marcatori (274 AFLP, 91 SSR e 3 SNP) sono stati posizionati sulla mappa del parentale femminile e 316 marcatori (205 AFLP, 105 SSR, 5 SNP e 1 marcatore morfologico) sulla mappa del parentale maschile. Questi marcatori sono distribuiti in 20 gruppi di associazione per la mappa femminile e 26 gruppi per la mappa maschile. Grazie ai marcatori SSR comuni alle mappe di pioppo già pubblicate e al confronto con la mappa fisica (sequenza genomica) di *Populus tri-*

chocarpa, è stato possibile identificare i 19 gruppi corrispondenti al numero aploide di cromosomi del pioppo nero. Le mappe ottenute non sono però saturate, infatti, il numero di gruppi osservati è superiore a 19. La lunghezza del genoma di pioppo nero è stata calcolata in 2789 cM per la mappa femminile e 2815 cM per la mappa maschile. Questi valori sono vicini a quelli pubblicati da Cervera *et al.* (2001) per il pioppo nero, 2791 cM. La distanza media tra marcatori è 8,9 cM per la mappa femminile e 7,6 cM per la mappa maschile. I marcatori sono distribuiti in maniera omogenea e la densità di marcatori non differisce significativamente tra i gruppi di associazione. Alcuni dei marcatori mappati corrispondono a geni specifici, in particolare 4 SSRs e 2 SNPs per la mappa femminile e 7 SSRs e 2 SNPs per la mappa maschile. Il confronto tra le mappe dei due parentali ha messo in evidenza la presenza di 62 marcatori comuni. Questi marcatori sono stati posizionati negli stessi gruppi, indicando una buona sintenia. Inoltre, l'ordine dei marcatori all'interno dei gruppi è simile tra le due mappe parentali, indice di una buona colinearità tra i due genomi. Le mappe genetiche da noi ottenute sono tra le più dense di marcatori SSR (105) finora pubblicate.

Le prospettive di questo studio includono l'applicazione della mappa di pioppo nero per la ricerca di QTL per caratteri adattativi (Fig. 2), quali la produzione di biomassa e la fenologia. Inoltre, sarà possibile eseguire un'analisi comparativa tra le mappe e i QTL di varie specie di pioppo, per l'ottenimento di una mappa *consensus* del genere *Populus*.

BIBLIOGRAFIA

Bradshaw H.D., Ceulemans R., Davis J., Stettler R. 2000. Emerging model systems in plant biology: poplar (*Populus*) as a model forest tree. *Journal of Plant Growth Regulation.* 19: 306-313.

Cervera M.T., Storme V., Ivens B., Gusmao J., Liu B.H., Hostyn V., Van Slycken J., Van Montagu M., Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three *Populus* species (*Populus deltoides, P. nigra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.

Gaudet M., Jorge V., Paolucci I., Beritognolo I., Scarascia-Mugnozza G. and Sabatti M. 2007. Genetic linkage maps of *Populus nigra* L. including AFLPs,SSRs, SNPs, and sex trait. *Tree Genetics & Genomes* DOI 10.1007/s11295-007-0085-1.

Mareschi L., Paris P., Sabatti M., Nardin F., Giovanardi R., Manazzone S., Scarascia-Mugnozza G. 2005. Le nuove varietà di pioppo da biomassa garantiscono produttività interessanti. *L'Informatore Agrario*, 18: 49-53.

Paris P., Sacchetti R., Scarascia-Mugnozza G., Pisanelli A., Cannata F., Todaro L. 2006. La robinia a turno breve vince nelle zone marginali. *Terra e Vita*, 48: 79-82.

Ragauskas A.J., Williams C.K., Davison B.H., Britovsek G., Cairney J., Eckert C.A., Frederick W.J.Jr., Hallett J.P., Leak D.J., Liotta C.L., Mielenz J.R., Murphy R., Templer R., Tschaplinski T. 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*, 311: 484-489.

Sabatti M., Kuzminsky E., Giordano E., Anselmi N. e Scarascia-Mugnozza G. 2000. Esperienze di rinaturalizzazione di terreni agricoli in Pianura Padana mediante piantagioni forestali. *L'Italia Forestale e Montana* 55: 241-252.

Scarascia-Mugnozza G., Sabatti M., Paris P. 2007. La produzione di biomassa da colture arboree: realtà italiana e prospettive. In: Nuove frontiere dell'arboricoltura italiana, a cura di S. Sansavini. Perdisa Editore, Bologna.

Taylor G. 2002. *Populus*: *Arabidopsis* for forestry. Do we need a model tree? *Annals of Botany*, 90: 681-689.