



Rendiconti
Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL
Memorie di Scienze Fisiche e Naturali
126° (2008), Vol. XXXII, P. II, pp. 7-30

LUIGI MONTI*

La genomica per la valorizzazione dell'agrobiodiversità**

Summary – The integration of genomics with biotechnologies, with bioinformatics and with the conventional methods of plant breeding and mutagenesis has determined a considerable progress in the valorisation of plant genetic resources.

The identification and the cloning of the genes in a plant genome have widened the genetic variability source to be used in plant breeding. A major significant role was taken by the crop related wild species.

Molecular markers associated with agronomic traits have accelerated the breeding programs for both the resistance to abiotic and biotic stresses and for quality traits. Also complex traits determined by QTL were improved through this technique.

Particularly relevant is the progress obtained in the production of new products of chemical and pharmaceutical interest.

The comparison of genomes has allowed the identification of conserved and repeated regions in the species, among species and among genera, which clarified the plant evolutionary and domestication process.

Examples of application of genomics in the different areas are reported in the paper.

1. Introduzione

La vita sul pianeta si basa principalmente sulla produzione agricola vegetale e sui prodotti da essa derivati. Nei paesi industrializzati questa realtà viene spesso dimenticata e viene ricordata solo quando c'è un aumento dei prezzi dei generi alimentari. Questo è successo anche negli ultimi tempi, a causa della carenza di prodotti agricoli sui mercati mondiali dovuta ad un maggior consumo alimentare di

* Socio dell'Accademia. Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II - Via Università, 100 - 80055 Portici (NA) - E-mail: lmonti@unina.it

** Prolusione tenuta in occasione dell'inaugurazione del 226° anno accademico. Roma, 24 aprile 2008, Biblioteca dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL, Scuderie Vecchie di Villa Torlonia.

alcune nazioni ed alla crisi energetica che ha indotto a produrre biomassa vegetale, molto spesso utilizzando specie vegetali di interesse alimentare o terreni non marginali. Un'altra grossa preoccupazione che si avverte nei Paesi industrializzati deriva dai cambiamenti climatici in atto ed in particolare dalle modificazioni delle temperature e dalla siccità che possono avere effetti devastanti sugli attuali sistemi agricoli e sulla stessa diversità vegetale esistente. Come ciclicamente purtroppo avviene, si dimentica che nel mondo la sottoalimentazione, la fame e la morte per carenza di cibo c'è sempre stata e colpisce ogni anno più di 800 milioni di persone.

La ricerca scientifica, la conservazione ed un uso sostenibile della biodiversità vegetale possono dare ancora una volta un notevole contributo per venire incontro a queste vecchie e nuove esigenze, sviluppando varietà che rispondano a questi scopi e che nel contempo siano più produttive ed anche ecosostenibili.

Questa relazione riporta i progressi ottenuti nel miglioramento genetico delle piante dalle applicazioni delle più recenti innovazioni della genetica e delle biotecnologie vegetali per ampliare la diversità genetica utilizzabile e per poterla usare in modo sostenibile.

2. L'agrobiodiversità per il miglioramento genetico

Le specie vegetali presenti sulla terra vengono stimate in 270.000-350.000, di cui solo una piccola parte è stata utilizzata dall'uomo per l'alimentazione o per altri scopi come foraggiere, piante da legna, da fibra, medicinali, ecc. Tuttavia, in tutto il mondo solo una minima parte di questo patrimonio (non più di 300 specie) è effettivamente coltivata dagli agricoltori seguendo determinati protocolli, con l'uso di particolari semi, fertilizzanti ed antiparassitari, seguendo specifiche pratiche colturali, dalla semina alla raccolta. Non più di 30 sono poi le specie su cui si basa l'alimentazione e la vita dell'uomo, tra le quali spiccano per importanza tre cereali (frumento, riso e mais) che da sole contribuiscono per il 60% a tutte le calorie utilizzate dall'uomo (tab. 1).

Se è vero che tutta la biodiversità vegetale merita di essere conservata, è anche vero che maggiore attenzione va data a quella parte di biodiversità che va sotto il nome di risorse genetiche vegetali, che comprende sia le specie coltivate che quelle di potenziale interesse per l'umanità. La variabilità genetica di queste specie si può ridurre a causa dell'erosione genetica, un fenomeno questo ben noto e che deriva da diverse cause; per ridurre questi rischi, si procede alla raccolta ed alla conservazione in apposite banche e collezioni del materiale con cui queste specie normalmente si riproducono. Nel mondo ci sono circa 1500 banche dei semi nelle quali sono conservati molti milioni di accessioni, di cui 4 milioni solo per le 30 specie più importanti (tab. 2). Di ciascuna di queste specie sono conservati semi delle varietà coltivate, dei tipi locali e delle specie selvatiche con esse imparentate. Una delle banche – la prima in Europa – è stata costituita a Bari dal CNR nel 1970 e custodisce germoplasma sopra tutto di frumenti.

La conservazione del germoplasma deve essere principalmente finalizzata ad

Tab. 1 – Numero di specie costituenti la biodiversità vegetale

~300.000	In totale
~30.000	Utilizzabili per l'alimentazione o altri scopi
~3.000	Utilizzate per l'alimentazione o altri scopi
~300	Coltivate
~30	Specie molto importanti
3	Frumento, riso e mais, da cui deriva il 60% delle calorie da vegetali

una sua utilizzazione per il miglioramento genetico, sfruttando caratteri e geni in esso presenti. Prima dell'era della genomica, il miglioramento genetico ha utilizzato la variabilità presente nell'ambito della specie da migliorare e nell'ambito di alcune specie selvatiche incrociabili con la specie da migliorare, la variabilità cioè che si ritrova nei primi tre gene-pools raffigurati in fig. 1. Nelle specie selvatiche (fig. 2) sono infatti presenti caratteri ed alleli che non hanno superato i filtri della domesticazione e delle selezioni, processi che hanno portato all'ottenimento delle varietà commerciali attualmente utilizzate. Molti programmi di miglioramento genetico per resistenza a stress biotici ed abiotici sono infatti derivati da incroci in cui uno dei due genitori era una specie selvatica portatrice di tali caratteri. Come vedremo successivamente, la genomica ha incrementato notevolmente la possibilità di identificare ed utilizzare alleli utili presenti nelle specie selvatiche.

Tab. 2 – Numero di accessioni delle 30 specie vegetali più importanti conservate nelle banche dei semi. Da [14]

Crop	Total accessions world-wide	Crop	Total accessions world-wide
Wheat (<i>Triticum</i>)	784,500	Chickpea (<i>Cicer</i>)	67,500
Barley (<i>Hordeum</i>)	485,000	<i>Prunus</i>	64,500
Rice (<i>Oryza</i>)	420,500	Clover (<i>Trifolium</i>)	61,500
Maize (<i>Zea</i>)	277,000	<i>Capsicum</i>	53,500
Garden bean (<i>Phaseolus</i>)	268,500	Cotton (<i>Gossypium</i>)	49,000
Oat (<i>Avena</i>)	222,500	Grape (<i>Vitis</i>)	47,000
Soybean (<i>Glycine</i>)	174,500	<i>Triticale</i>	40,000
<i>Sorghum</i>	168,500	Alfalfa (<i>Medicago</i>)	33,000
<i>Brassica</i>	109,000	Sweet potato (<i>Ipomoea</i>)	32,000
Apple (<i>Malus</i>)	97,500	Potato (<i>Solanum tuberosum</i>)	31,000
Millet (<i>Eleusine, Panicum</i>)	90,500	Fava bean (<i>Vicia faba</i>)	29,500
Cowpea (<i>Vigna</i>)	85,500	Sunflower (<i>Helianthus</i>)	29,500
Groundnut (<i>Arachis</i>)	81,000	Lupin (<i>Lupinus</i>)	28,500
Tomato (<i>Lycopersicon</i>)	78,000	Cassava (<i>Manihot</i>)	28,000
Pea (<i>Pisum</i>)	72,000	Rye (<i>Secale</i>)	27,000
Total			4,038,000

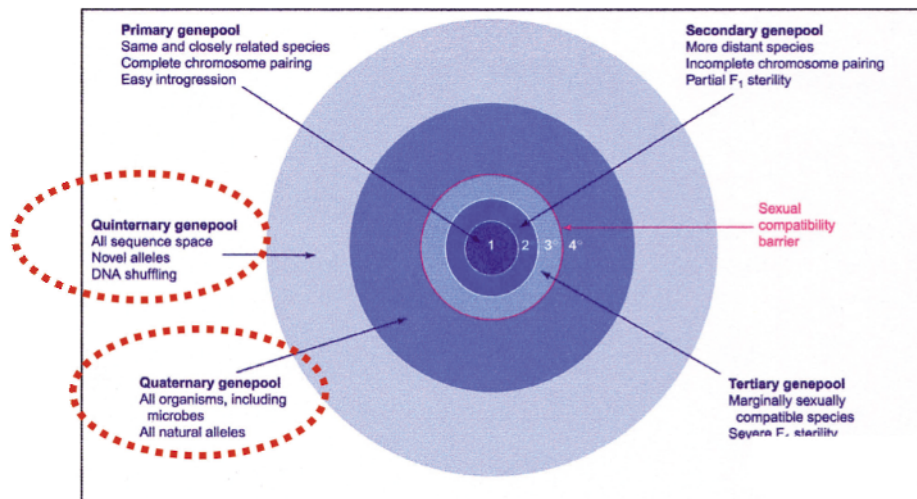


Fig. 1. I cinque gene pools della variabilità genetica di una specie [23].

3. Con la genomica i gene pools sono passati da tre a cinque

I progressi negli studi di biologia molecolare e della genomica strutturale in particolare, hanno reso possibile identificare i geni presenti in un genoma, analizzarli dal punto di vista strutturale e facilitare l'utilizzazione di una notevole quantità di alleli favorevoli di geni che svolgono ruoli importanti nelle piante. Progressi ancora più eclatanti si sono avuti con la genomica funzionale che sta permettendo di comprendere le funzioni dei geni sia a partire dal fenotipo (forward genetics) che a partire dal gene (reverse genetics).

Queste ricerche di genomica hanno determinato la necessità di conservare le svariate sequenze di DNA utilizzate nei diversi programmi di genetica vegetale;

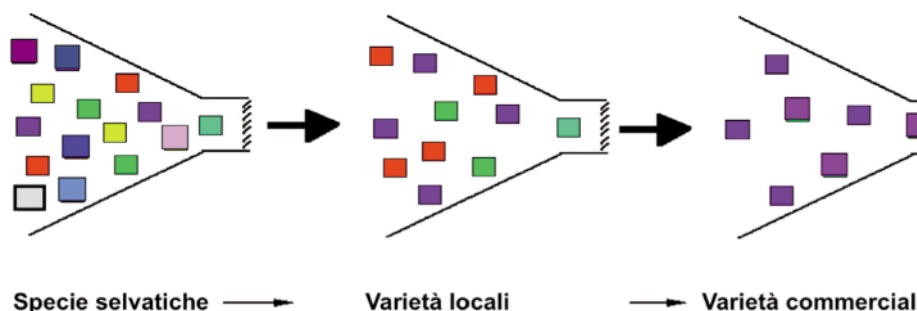


Fig. 2. Riduzione della variabilità genetica determinata durante il processo di domesticazione e la selezione operata dall'uomo [30].

sono state costituite banche del DNA e si stima in più di 50 milioni le sequenze attualmente conservate in tutto il mondo (fig. 3). Sono state costituite banche di DNA genomico, di RNA e di librerie di cDNA che sono utilizzate per studi sull'espressione genica, per l'identificazione di geni, per l'ottenimento di marcatori molecolari, per l'analisi della variabilità e per studi di tassonomia. La tab. 3 riporta un esempio di geni di resistenza isolati e clonati in pomodoro, le cui sequenze sono presenti nei genebanks e disponibili per i ricercatori interessati.

Una di queste banche è stata di recente costituita a Bari presso l'Istituto di Genetica Vegetale del CNR [24], ad integrazione della banca dei semi ivi costituita. Questa banca conserva i semi ed il DNA di specie di interesse mediterraneo e di ecotipi di particolare interesse italiano ed è a disposizione per scambi con altri istituti di ricerca. I principali scopi di questa banca sono riportati in tab. 4.

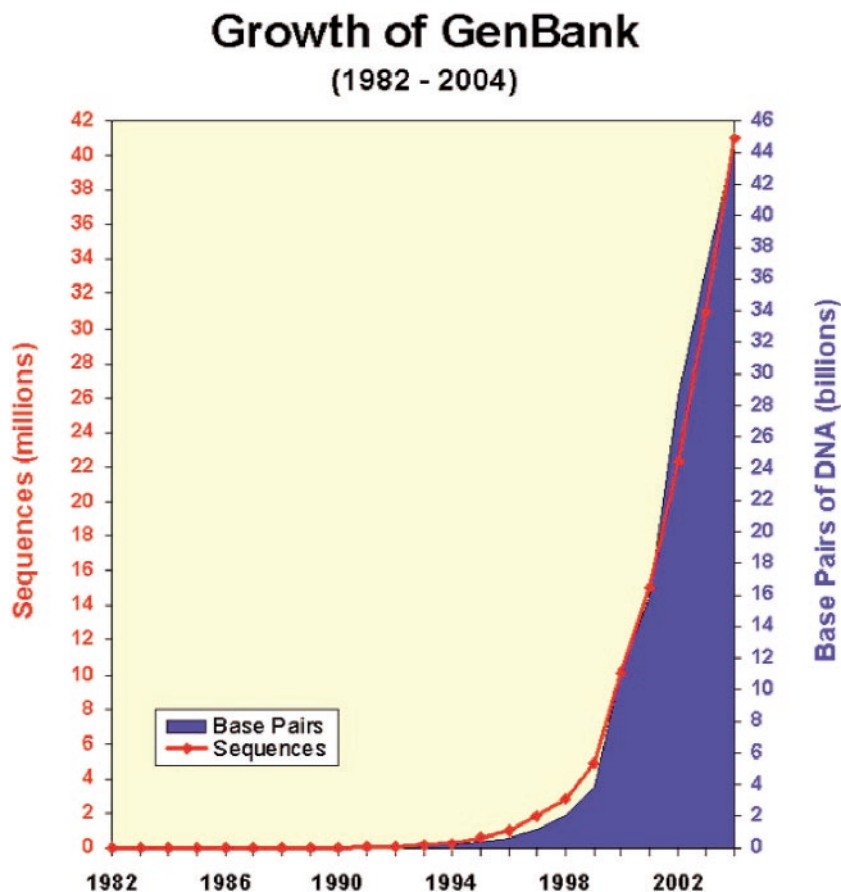


Fig. 3. Numero di sequenze e di coppie di basi di DNA contenute nei genbanks [27].

Tab. 3 – Geni di resistenza isolati e clonati in pomodoro le cui sequenze sono disponibili nei GenBanks

Gene	Pathogen	Chromosome
<i>Asc-1</i>	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	3
<i>Bs4</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv <i>vesicatoria</i>	5
<i>Cf2, Cf4, Cf5, Cf9</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	1, 6
<i>Hero</i>	<i>Globodera rostochiensis</i>	4
<i>I2</i>	<i>Fusarium oxy sporum</i> f sp <i>lycopersici</i>	11
<i>Mi</i>	<i>Meloidogyne</i> spp	6
<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>	5
<i>Sw5</i>	TSWV	9
<i>Tm2a</i>	TMV	9
<i>Ve1, Ve2**</i>	<i>Verticillium dahliae</i>	9

Tab. 4 – Caratteristiche della banca del DNA istituita nel 2005 a Bari nell'Istituto di Genetica Vegetale del CNR

Scopo: Realizzazione di un sistema integrato con la banca dei semi per la conservazione e l'utilizzazione delle risorse genetiche vegetali
<p>DNA conservato:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Varietà locali di particolare interesse ▪ Specie selvatiche ▪ Specie modello ▪ Librerie cDNA e genomiche ▪ Geni isolati, cloni, mutanti, etc. ▪ Marcatori molecolari specifici <p>Uso del DNA conservato:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Identificazione di nuovi marcatori molecolari ▪ Isolamento di geni ▪ Caratterizzazione di geni isolati ▪ Valutazione della diversità genetica ▪ Monitoraggio delle strutture genetiche di popolazioni ▪ Studio delle relazioni tassonomiche ▪ Studio della tracciabilità dei prodotti vegetali ▪ Servizio di conservazione e distribuzione di DNA ad Istituti di Ricerca

In conseguenza dei progressi della genomica, la variabilità genetica resa disponibile per il miglioramento genetico si è ampliata in misura notevole, potendo ora disporre anche di geni presenti in specie più lontane od in altri organismi o di geni creati artificialmente, attraverso l'assemblaggio di frammenti di diversi geni (DNA shuffling). In questo modo i gene pools utilizzabili per il miglioramento genetico dai tre tradizionali sono divenuti cinque (fig. 1), con la possibilità di ottenere le cosiddette piante transgeniche di cui ci occuperemo successivamente.

Il primo genoma vegetale interamente sequenziato è stato nel 2000 quello dell'*Arabidopsis thaliana*, una pianta di nessuna importanza agronomica ma con un genoma relativamente piccolo (125 Mbp), che contiene tuttavia l'80-90% dei geni necessari per la crescita e lo sviluppo delle piante di interesse agrario. All'*Arabidopsis* sono poi seguiti i sequenziamenti di riso e di vite. Attualmente sono in corso i sequenziamenti di numerose altre specie vegetali, come mais, orzo, pomodoro, patata, erba medica, *Lotus*, soia, cavolfiore, pioppo, melo e banana. Le difficoltà ovviamente aumentano con le dimensioni del genoma (il frumento ha una grandezza di 17000 Mbp), ma le tecnologie di laboratorio stanno facendo progressi notevoli, con conseguenti riduzioni di costi e di tempi di esecuzione.

La genomica ha permesso di rendere più efficienti l'identificazione e l'utilizzazione di regioni genomiche presenti nella biodiversità naturale per il miglioramento genetico di caratteri di rilevante interesse agronomico, la maggior parte dei quali è controllato da QTL (Quantitative Trait Loci). In questi programmi, il principale problema è l'identificazione dei QTL più utili che codificano per quel carattere. Alleli utili sono stati ritrovati nelle specie selvatiche di diverse piante coltivate, alleli che non avevano superato i filtri della domesticazione o della selezione effettuata dall'uomo per costituire le moderne varietà commerciali [11]. Con appropriate strategie molecolari si è ottenuta la mappatura di alcuni di questi alleli, e nel 2000 anche la clonazione dei primi QTL, che codificavano per la grandezza della bacca di pomodoro e per la resa in solidi solubili [63], [7].

Attraverso un programma di breeding molecolare, basato sul «pyramiding» di QTL di origine selvatica, è stata infine costituita una nuova cv di pomodoro, la AB2, che attualmente è quella più coltivata negli USA per la produzione di ketchup [13], [34].

Recentemente, in mais, sono stati identificati nella biodiversità naturale geni importanti per il contenuto e la composizione in olii e per gli aspetti nutrizionali [15], [35]. Questi risultati hanno decretato in via definitiva l'importanza della biodiversità naturale, nella forma di specie selvatiche o vecchie varietà, come fonte di caratteri e geni e quindi la necessità della loro raccolta e conservazione nelle banche dei semi e del DNA. Le specie selvatiche più o meno imparentate con le specie coltivate rappresentano, infatti, il più vasto deposito di geni non ancora utilizzati ed ora resi disponibili con la genomica e con le nuove tecnologie.

4. I progressi ottenuti nelle conoscenze sulla evoluzione delle piante

Integrando le banche genetiche (collezioni di piante, di semi e di DNA), con le conoscenze di genomica strutturale e funzionale, con la mutagenesi sperimentale [25], con le nuove biotecnologie (la selezione assistita da marcatori genetici, la tecnica del DNA ricombinante e le colture *in vitro*) e con l'indispensabile ausilio della bioinformatica, è oggi possibile studiare e caratterizzare a livello del DNA la variabilità genetica presente nei diversi tipi di una specie tenuta in collezione e confrontare questa variabilità con quella di altre specie.

Da questi confronti tra sistemi genetici diversi, sono state determinate le relazioni filogenetiche, i centri di differenziamento e le distanze genetiche tra le diverse specie di uno stesso genere e si sono individuate in questo modo le specie selvatiche più interessanti per introgredire alleli utili. La fig. 4 illustra quanto emerso di recente da uno studio nel genere *Cynara*, che ha permesso di evidenziare che la distanza genetica tra carciofi e cardi selvatici è inferiore a quella esistente tra car-

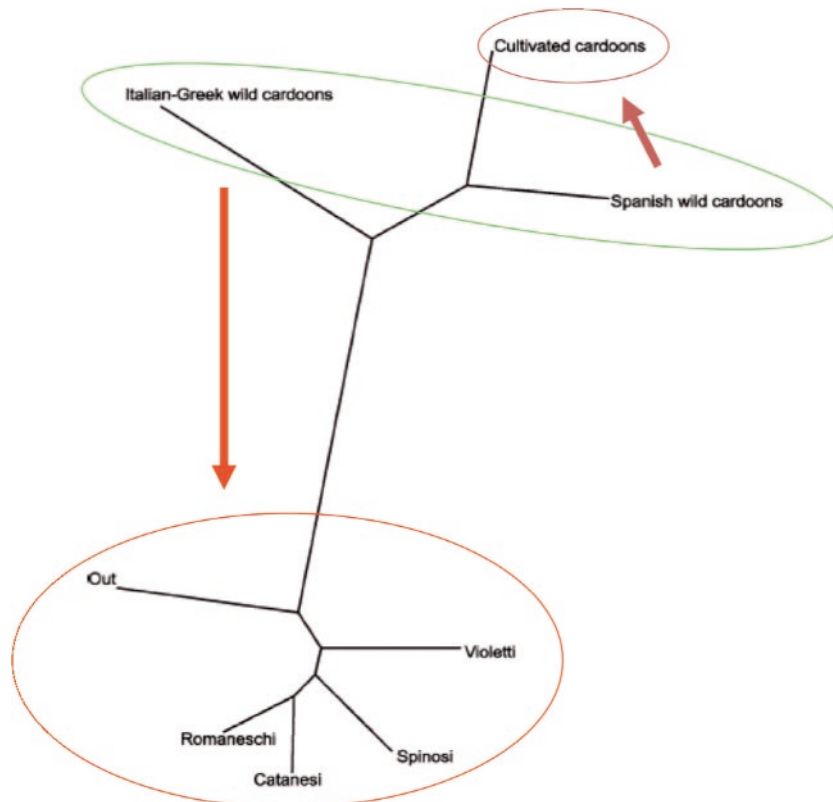


Fig. 4. Distanze genetiche nel genere *Cynara*. Da [29].

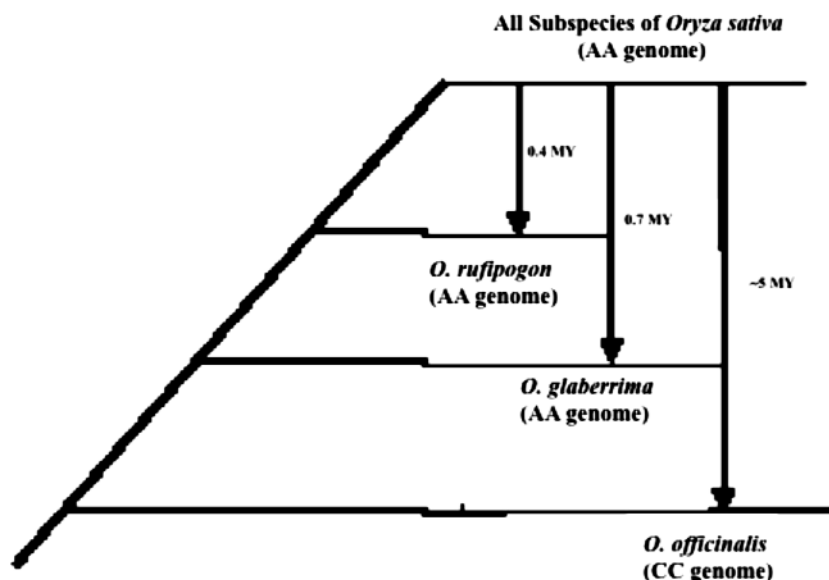


Fig. 5. Relazione filogenetica tra le specie di riso [9].

ciofi e cardì coltivati e che la domesticazione tra carciofo e cardo è avvenuta in tempi e luoghi diversi, il carciofo per primo ai tempi dei romani forse in Sicilia ed il cardo successivamente nel nord del Mediterraneo, [29].

I progressi della conoscenza sul genoma hanno permesso ancora di studiare la variabilità presente in una specie a livello di singole sequenze del DNA (microsatelliti) con una capacità di risoluzione prima impensabile. Uno studio a questi livelli in riso ha approfondito la diversa variabilità genetica esistente tra le specie ed attraverso analisi bioinformatiche ha reso possibile delineare la storia evolutiva e la domesticazione del riso ed i rapporti con le specie selvatiche, nonché le distanze genetiche tra le specie stesse. È stato addirittura possibile avere indicazioni su quando è avvenuta la divergenza di una specie da un'altra; è stato stimato che la divergenza tra le diverse specie di riso è avvenuta da 400 mila a 5 milioni di anni fa (fig. 5), in epoche cioè molto remote se si pensa che l'origine dell'agricoltura è stata stimata a circa 15000 anni fa.

Il confronto tra i genomi di specie diverse appartenenti a generi diversi ha poi permesso di identificare le sequenze di DNA che si sono conservate durante l'evoluzione e che si ritrovano quindi in corrispondenza nei diversi genomi. La fig. 6 riporta le corrispondenze tra le sequenze di 9 specie di graminacee a partire dal riso che ha il genoma più piccolo. Grazie alla sintenia, la conoscenza del genoma di una specie facilita ed accelera molto i programmi di sequenziamento di altre specie filogeneticamente vicine e permette di prevedere la localizzazione di geni importanti in altre specie.

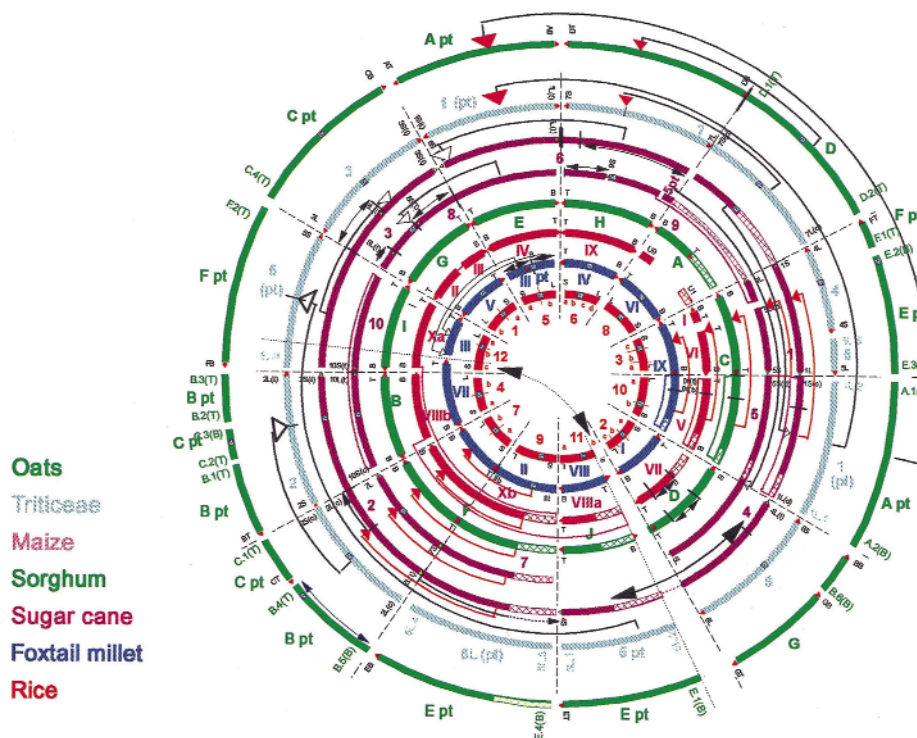


Fig. 6. Corrispondenza tra genomi di graminacee [8].

Inoltre, il confronto intragenomico delle sequenze molecolari presenti sui diversi cromosomi ha rivelato la presenza di duplicazioni nel genoma, testimonianza della sua storia evolutiva. Ad esempio, la presenza di duplicazioni nel genoma riscontrata in *Arabidopsis* (fig. 7) e poi anche in altre specie, rivela eventi di duplicazione dell'intero genoma, probabilmente legati a fenomeni di poliploidizzazione, poi seguiti da perdita massiccia di geni e riorganizzazioni attraverso un processo definito di diploidizzazione [16].

Ciò consente di definire l'*Arabidopsis* una specie paleopoliploide [32] così come il riso [33] ed il mais [10]. La diffusione del fenomeno fa pensare ad un possibile vantaggio evolutivo relativo alla presenza di materiale genetico ridondante. I geni duplicati, ora individuati in modo inequivocabile con la genomica, conferiscono maggiore tolleranza a cambiamenti delle condizioni ambientali [12] e sono quindi importanti per l'adattamento, così come già indicato da Muller nel 1925 [25].

Gli studi di genomica non solo hanno permesso un confronto tra i genomi a livello intergenerico, interspecifico ed intraspecifico, di cui abbiamo riferito sopra, ma hanno permesso di indagare anche le variazioni a livello di singolo gene. La

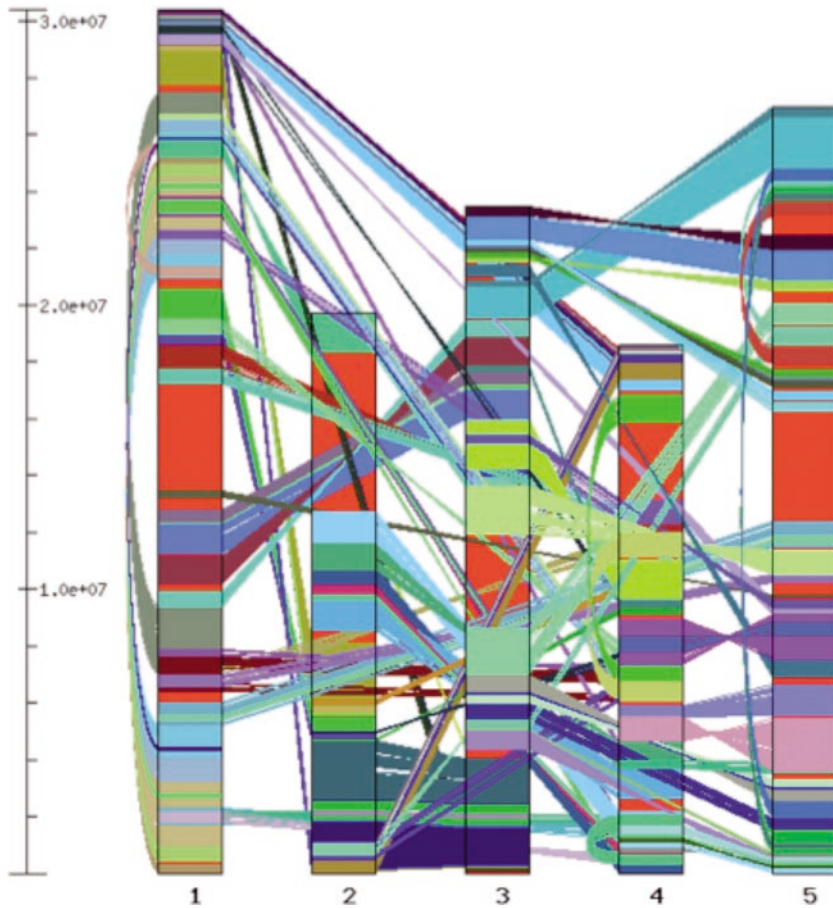


Fig. 7. Duplicazioni molecolari nei cinque cromosomi di *Arabidopsis thaliana* [16].

fig. 8 riporta la struttura del gene *Mi*, un gene isolato nella specie selvatica *Lycopersicon peruvianum* e che in pomodoro conferisce resistenza ai nematodi. Questo gene, una volta trasferito in patata, si è dimostrato capace di conferire resistenza anche agli afidi. È stata effettuata in più accessioni selvatiche un'analisi della variabilità di questo gene e sono stati rilevati polimorfismi di sequenze che potrebbero avere implicazioni sulla storia evolutiva del gene e sulla sua funzionalità. (Ercolano, comunicazione personale).

5. I progressi ottenuti nel miglioramento genetico

Una delle applicazioni più utilizzata degli studi sulle sequenze molecolari nei vegetali è stata l'identificazione dei genotipi già nei primi stadi di sviluppo delle

Mi GENE

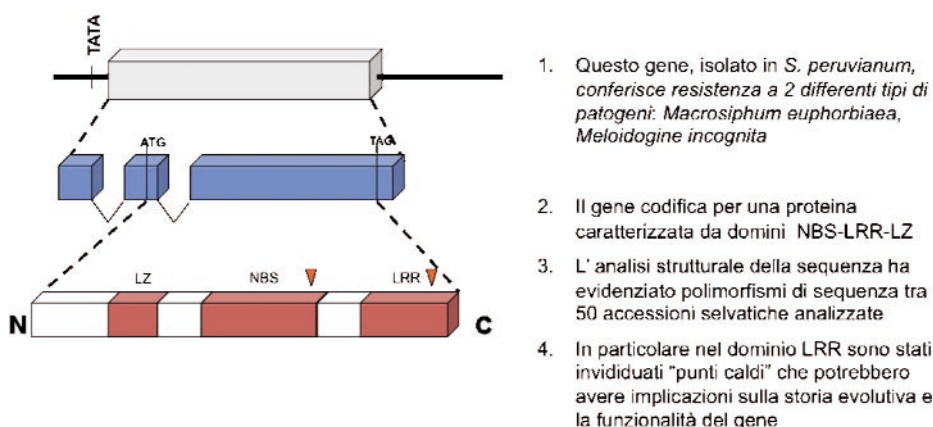


Fig. 8. Analisi strutturale della sequenza del gene Mi di pomodoro.

piante; è stato così possibile distinguere e marcare a livello molecolare i tanti ecotipi che caratterizzano la nostra agricoltura e che contraddistinguono le cucine delle diverse realtà regionali. Numerose sono le specie che sono state studiate da questo punto di vista (tab. 5) con risultati utili per i consumatori, per i vivaisti e per gli agricoltori. Questo tipo di analisi si è poi esteso all'intera filiera dal prodotto primario al prodotto trasformato, permettendo una tracciabilità genetica di numerosi prodotti vegetali, il che apre la possibilità di un controllo delle specie e delle varietà presenti nel prodotto trasformato a tutela del consumatore e del «made in Italy». Alcuni esempi di questo tipo di analisi sono riportati nella fig. 9 su derivati da olio di oliva e da melo. Di recente si sta tentando, anche se con difficoltà, di utilizzare sequenze molecolari come «barcoding» di prodotti alimentari [19].

Mentre questo uso dei marcatori molecolari serve solo a fotografare una situazione, ben più interessante per il miglioramento genetico è l'identificazione e l'utilizzazione di marcatori che risultano associati con caratteri di interesse agronomico. È sempre più diffusa infatti la tecnica della selezione assistita da marcatori molecolari (MAS: marker assisted selection), che prevede innanzi tutto l'identificazione di geni utili nei diversi gene pools e poi l'identificazione di markers ad essi associati, utilizzando i quali effettuare la selezione. In questo modo si riesce ad accelerare notevolmente i programmi di breeding. La tecnica è poi di particolare utilità negli incroci con specie selvatiche afferenti al terzo pool genetico, nelle quali sono presenti numerosi geni utili particolarmente per resistenza o tolleranza a stress biotici ad abiotici. Si riportano qui i risultati di ricerche svolte in *Solanum*, un genere cui

Tab. 5. Esempi di varietà locali caratterizzate con marcatori molecolari

- Pomodoro «Vesuviano»	- Carciofo «Spinoso di Sciacca»
- Pomodoro «S. Marzano»	- Asparago «Violetto di Albenga»
- Pomodoro «Sorrento»	- Radicchio «Rosso di Chioggia»
- Pomodoro «Corbarino»	- Radicchio «Variegato di Castelfranco»
- Pomodoro «Africano»	- Olivo «Dritta»
- Pomodoro «Tondo di Sulmona»	- Olivo «Paesana Bianca»
- Pomodoro «A pera»	- Olivo «Frantoio»
- Pomodoro «Grosso di Maria»	- Melo «Annurca»
- Fagiolo «di Controne»	- Pero «Madermassa»
- Fagiolo «Occhio nero Oliveto Citra»	- Nocciolo «Tonda di Giffoni»
- Fagiolo «di Sarcione»	- Nocciolo «Tonda delle Langhe»
- Fagiolo «Poverello»	- Nocciolo «Napoletanedda»
- Fagiolo «Marruzzo»	- Nocciolo «Riccia di Talanico»
- Fagiolo «Verdolino»	- Vite «Brachetto d'Aqui»
- Fagiolo «Zolfino del Pratomagno»	- Vite «Brachetto di Nizza Monferrato»
- Sedano «nero di Trevi»	- Vite «Lugana»
- Farro «di Monteleone»	- Arancio «Tarocco Sciré»
- Lenticchia «Castelluccio di Norcia»	- Mandarino «Avana»
- Cipolla «di Cannara»	- Mandarino «Tardivo di Ciaculli»
- Aglio «di Vessalico»	- Limone «Lunario»
- Carciofo «Romanesco»	- Limone «Sessini Villacidro»
- Carciofo «Castellamare»	

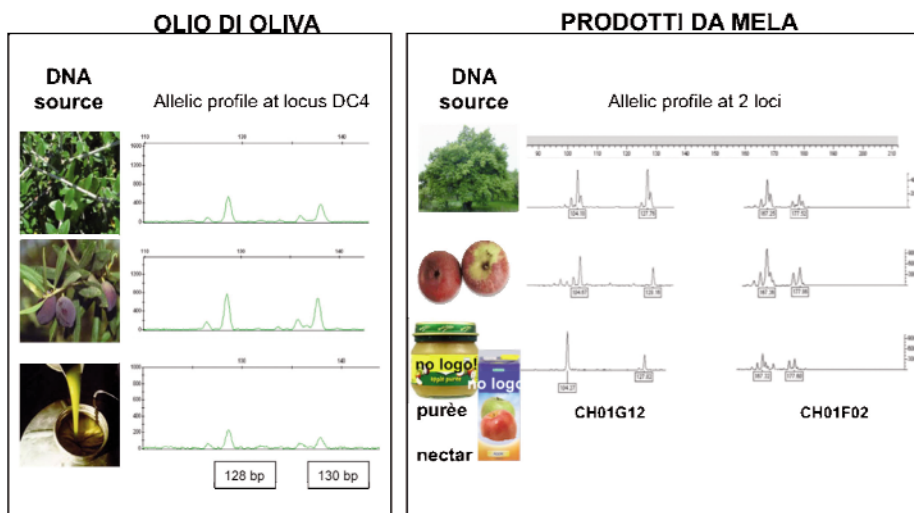


Fig. 9. Tracciabilità genetica con marcatori SSR di prodotti ottenuti da olivo e melo [28].

afferiscono molte specie di notevole interesse per il miglioramento genetico della patata in quanto non solo posseggono geni di interesse agronomico ma sono anche specie utilizzabili in incroci con la patata stessa, attraverso metodologie che aiutano a superare le barriere interspecifiche [1]. La tab. 6 riporta i geni che sono stati identificati in *S.commersonii* e che risultano implicati nella risposta a stress ambientali; la tab. 7 riporta invece i geni di resistenza a virus, batteri, funghi, nematodi ed insetti reperiti in una collezione di specie selvatiche sempre in *Solanum* [2].

Tab. 6 – Geni implicati nella risposta a stress ambientali isolati da *Solanum commersonii*

Gene	Prodotto	Ruolo sotto stress
∇9 des	∇9 stearyl desaturase	Increase of fatty acid - Unsaturation level ⁽¹⁾
∇12 des	∇12 oleoyl desaturase	Increase of fatty acid - Unsaturation level ⁽²⁾
cal 1	calmodulin (Ca ⁺⁺ binding)	Stress signal transduction ⁽³⁾
cal 3	calmodulin (Ca ⁺⁺ binding)	Stress signal transduction ⁽³⁾
cal 5	calmodulin (Ca ⁺⁺ binding)	Stress signal transduction ⁽³⁾
G1-1	plasmalemma H ⁺ - ATPase	ion homeostasis ⁽³⁾
pH27	Ca ⁺⁺ - ATPase	ion homeostasis ⁽³⁾
N1	Dehydrin	protection of cellular structures ⁽⁴⁾
N3	chaperonin	protein folding and assembly ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ [5]

⁽²⁾ Grillo, comunicazione personale

⁽³⁾ [22]

⁽⁴⁾ [21]

Utilizzando la MAS in un programma di miglioramento genetico del pomodoro, è stato possibile ottenere in alcuni genotipi di valore commerciale la presenza contemporanea di numerosi geni di resistenza (Barone, comunicazione personale).

La conoscenza del genoma di pomodoro ha reso poi possibile l'identificazione di un meccanismo di resistenza delle piante agli afidi. Lo studio di espressione di geni di difesa in ecotipi di pomodoro tolleranti l'attacco afidico ha infatti evidenziato che, alla base del meccanismo di tolleranza, c'è l'espressione costitutiva dei geni di difesa HPL, LOXC, CGS e P4. L'interazione delle piante di pomodoro con il *Macrosiphon euphorbiae* determina, nei genotipi tolleranti, un'ulteriore sovraespressione di questi geni individuando per essi un importante ruolo nella difesa contro afidi in pomodoro (fig. 10) (Rao, comunicazione personale).

Con lo sviluppo della genomica, delle biotecnologie e delle tecniche di coltura *in vitro* è stato possibile ottenere piante transgeniche, utilizzando geni presenti in altri generi o in altri organismi, cioè dal gene pool quaternario di cui si è detto sopra. La coltivazione di piante geneticamente modificate (PGM) è da molto

Tab. 7 – Geni per la resistenza presenti in specie selvatiche del genere *Solanum* e mappati sulla mappa RFLP [2]

Carattere	Geni mappati (N°)	Specie selvatica
GENI DI RESISTENZA		
Virus		
PVX	3	acl, adg, phu
PVY	2	adg, sto
PVA	1	adg
Nematodi		
<i>Globodera rostochiensis</i>	7	adg, spg, ver
<i>Globodera pallida</i>	4	spg, ver
<i>Meloidogyne chitwoodii</i>	1	blb
Batteri		
<i>Erwinia carotovora</i>	13	chc, yun
Funghi		
<i>Phytophthora infestans</i>	8	ber, bib, dem, pin
Insetti		
<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	10	ber

¹ acl = *S. acaule*; adg = *S. andigena*; ber = *S. berthaultii*; blb = *S. bulbocastanum*; chc = *S. cha-coense*; dem = *S. demissum*; phu = *S. phureja*; pin = *S. pinnatosectum*; spg = *S. spegazzinii*; sto = *S. stoloniferum*; ver = *S. vernei*.

tempo oggetto di grande dibattito su cui è inutile soffermarsi, dato che su questo tema sono già intervenute nel 2004 numerose società scientifiche ed Accademie, tra cui quella delle Scienze detta dei XL, con un Consensus Document su «Sicurezza Alimentare e OGM».

Desidero solo ricordare che la transgenesi è ottenibile in numerose specie, che piante transgeniche sono coltivate oramai su più di 80 milioni di ettari in tutto il mondo, che il prodotto ottenuto è commercializzato ed utilizzato praticamente ovunque e che non sono stati accertati casi di danno alla salute o all'ambiente. C'è da aggiungere che i vincoli legislativi posti alla loro coltivazione in Italia ed in Europa non solo stanno danneggiando gli agricoltori ed i consumatori ma stanno anche notevolmente limitando la ricerca e la sperimentazione in questo settore. Sono 10 le specie transgeniche già in commercio (Tab. 8), che risultano migliorate per le resistenze, la qualità, il colore dei fiori e la maschiosterilità e molte altre stanno per essere commercializzate. Per ridurre l'impatto psicologico sui consumatori, la ricerca si è impegnata a produrre piante transgeniche utilizzando geni pre-

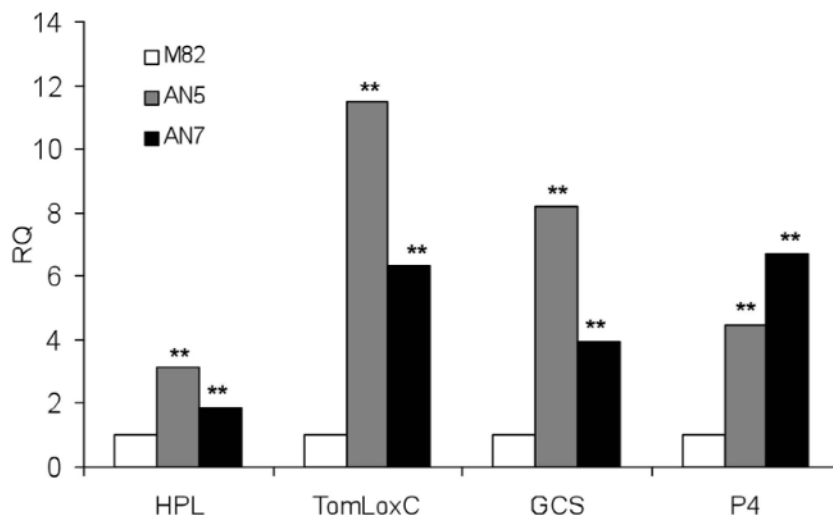


Fig. 10. Espressione costitutiva dei geni di difesa indicati in ecotipi di pomodoro tolleranti agli afidi (AN5 e AN7) e nella varietà suscettibile M82. Per ciascun gene il grafico mostra la quantificazione relativa (RQ) del gene target in M82 (colonne bianche), AN5 (colonne grigie) e AN7 (colonne nere). Gli asterischi indicano che i valori del $2^{-\Delta Ct}$ sono significativamente diversi dal calibratore (M82) ($p < 0.01$; Student's *t*-test).

levati da altri vegetali. Malgrado ciò, anche queste piante, chiamate cisgeniche, devono sottostare alla stessa normativa sugli OGM il che impedisce di svolgere anche su di esse la sperimentazione di campo. È da sottolineare che piante cisgeniche sono state già ottenute su specie di notevole interesse agroalimentare, come patata, pomodoro, mais, riso, colza e cotone (tab. 9).

Un'utilizzazione sostenibile dell'agrobiodiversità può contribuire in modo consistente non solo alla riduzione dell'enorme problema della fame nel mondo, ma anche a produrre alimenti utili per la salute. Molte malattie possono essere prevenute con una dieta in cui sono presenti adeguati livelli dei cosiddetti metaboliti nutraceutici cioè dei metaboliti in qualche maniera importanti per la salute dell'uomo. Carotenoidi, glucosinolati, fitoestrogeni e sostanze fenoliche sono gruppi di sostanze notevolmente presenti nelle piante di cui fanno parte molti composti bioattivi, come per esempio licopene, luteina, glucofaranina, genistina, daidzeina e resveratrolo presenti in molti prodotti alimentari, come pomodoro, spinaci, broccoli, legumi ed uva.

Le biotecnologie possono essere utilizzate per studiare i pathway metabolici di queste sostanze e nel miglioramento genetico con la selezione assistita da marcatori molecolari per ottenere varietà che presentino una maggiore o migliore produzione del metabolita stesso. Di recente sono stati identificati nelle specie selvatiche molti

Tab. 8 – Piante transgeniche in commercio

Carattere	Gene utilizzato	Specie	Effetto gene inserito
Resistenza ad insetti	Cry e Bt (<i>Bacillus thuringensis</i>)	cotone mais	Proteine tossiche per gli insetti
Tolleranza ad erbicidi	EPSPS (pianta)	soia mais	Insensibilità all'erbicida glifosato
	PAT (batterio)	soia cotone mais	Insensibilità all'erbicida gufosinate ammonio
	BXN(batterio)	cotone	Resistenza all'erbicida bromoxynil
	Bar (batterio)	soia cotone	Insensibilità all'erbicida gufosinate ammonio e fosfinotricina
Resistenza a virus	CP (virus)	patata	Resistenza al virus Y della patata
	RNA antisenso	zucca	Interferenza con la replicazione del virus
	Fny (replicasi mutata del virus CMV)	zucca	
Maschiosterilità	Barnase (batterio)	mais	Maschiosterile e resistente ad erbicidi
	Barnase/Barstar (batterio)	mais colza radicchio	Distruzione cellule del tappeto dell'antera e ristorazione maschiosterilità
Colore del fiore	ACC sintasi antisenso (pianta)	garofano	Blocco della sintesi dell'etilene
	DF reductasi antisenso (pianta)	garofano	Blocco della sintesi degli antociani
Contenuto di nicotina	nicotinate-nucleotide pyrophosphorylase antisenso (<i>Nicotiana tabacum</i>)	tabacco	Riduzione del contenuto di nicotina
Contenuto di acidi grassi	D12	soia colza	Aumento del contenuto di acido oleico

Tab. 9 – *Piante cisgeniche*

Gene	Isolato da	Trasferito a	Effetto
Seed albumin (<i>AmA1</i>)	Amaranto	Patata	Miglioramento del valore nutrizionale
Dehydration responsive element binding factor 1 (<i>CBF1</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pomodoro	Tolleranza a freddo e stress ossidativi
Sterol methyltransferase (<i>GmSMT1</i>)	Soia	Patata	Riduzione di colesterolo e glicocalcoidi
Homogentisic acid geranylgeranyl transferase (<i>HGGT</i>)	Orzo	Mais	Aumento del contenuto di antiossidanti
Hydroxycinnamoyl transferase (<i>HQT</i>)	Pomodoro	Pomodoro	Aumento di acido clorogenico
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase (<i>PK1</i>)	Tabacco	Mais	Tolleranza al freddo
Vacuolar H ⁺ -pyrophosphatase (<i>AVP1</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Pomodoro	Tolleranza alla siccità
<i>CBF/DREB1</i> -like transcription factors (<i>BNCBF5</i> and <i>17</i>)	<i>Brassica</i> spp.	Colza	Tolleranza al freddo ed aumento dell'efficienza fotosintetica
Vacuolar sodium/proton antiporter (<i>AtNHX1</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cotone	Tolleranza al sale e miglioramento qualitativo delle fibre
Stress responsive gene (<i>SNAC</i>)	Riso	Riso	Tolleranza alla siccità e al sale

geni che hanno influenza sulla qualità nutrizionale; questi geni sono stati clonati ed inseriti in varietà commerciali per l'ottenimento di nuove varietà (tab. 10).

Un capitolo molto promettente per la salute dell'uomo è quello relativo alla produzione in vegetali di sostanze naturali di interesse farmaceutico. In realtà, le piante sono sempre state la fonte primaria di sostanze medicinali ed anche oggi si stima che più di un quarto dei farmaci commercializzati contengano molecole di origine vegetale direttamente estratte dalle piante o industrialmente prodotte da sintesi chimica e che più della metà dei farmaci antitumorali derivi direttamente od indirettamente dalle piante. Tra gli esempi più noti sono da ricordare il Chinino e l'Artemisina per la malaria, il Taxol e il Vincristina per il cancro e la morfina come analgesico. La tab. 11 riporta una lista di piante accreditate dalla medicina più o meno popolare come capaci di avere proprietà farmaceutiche e su cui la ricerca

Tab. 10 – Geni da specie selvatiche utili per migliorare la qualità nutrizionale di vegetali. Da [4] e [18]

Geni	Sostanze	Specie
Phytoene synthase (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>) Lycopene cyclase (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>)	Provitamin A	<i>Oryza sativa</i>
γ -tocopherol methyl transferase (<i>Arabidopsis</i>)	Vitamin E	<i>Brassica napus</i>
Chalcone isomerase (<i>Petunia</i>)	Flavonodis	<i>Solanum lycopersicum</i>
1-sucrose: sucrose fructosyl transferase (<i>Helianthus tuberosum</i>)	Fructans	<i>Beta vulgaris</i>
6G-FFT (<i>Allium cepa</i>)	Fructans	<i>Cichorium intybus</i>
Tocopherol cyclase (<i>Arabidopsis</i>)	Tocoferol	<i>Brassica napus</i>
PSY (<i>Narcissus pseudonarcissus</i>)	Carotenoid	<i>Oriza sativa</i>

cerca oggi di identificare e caratterizzare i profili metabolici delle molecole responsabili e laddove possibile i relativi geni. Le specie di *Salvia*, per esempio, producono metaboliti secondari di interesse farmaceutico. In particolare *Salvia sclarea* produce diterpeni con attività antitumorali quali l'etiopinone. Approcci sia di elicitazione di colture cellulari di *S.sclarea* o di ingegneria metabolica in radici avventizie hanno dimostrato che è possibile aumentare la sintesi e l'accumulo di questi composti bio attivi [20].

Tab. 11 – Piante considerate interessanti per le loro proprietà farmaceutiche

Specie	Proprietà
<i>Cynara scolimus</i>	Ipocolesterolemizzante
<i>Matricaria chamomilla</i>	Antinfiammatoria
<i>Artemisia vulgaris</i>	Sedativa
<i>Artemisia annua</i>	Antimalarica
<i>Taraxacum officinalis</i>	Tonica
<i>Aster spp.</i>	Anticancerogena
<i>Asparagus officinalis</i>	Diuretica
<i>Allium sativum</i>	Ipotensiva-antisettica
<i>Allium cepa</i>	Ipoglicemizzante
<i>Melissa officinalis</i>	Coleretica
<i>Salvia officinalis</i>	Antisettica
<i>Lavandula angustifolia</i>	Antispasmodica
<i>Capsicum annuum</i>	Vitaminizzante
<i>Rosa canina</i>	Antinfiammatoria
<i>Fragaria vesca</i>	Diuretica
<i>Verbena officinalis</i>	Antireumatica

Tab. 12 – *Biofarmaci e vaccini prodotti in pianta. Da [31] e [3]*

Company / Institution	Plant used	Product	Indication	Clinical Stage
Meristem Therapeutics	Maize	Gastric lipase	Cystic fibrosis	Phase 2
	Maize	Lactoferrin	Gastrointestinal disorders	Phase 1
Planet Biotechnology	Tobacco	slgA «CaroRx»	Prevention of tooth decay	Phase 2, granted an EU licence as a medical device Seeking EU distribution partner.
	Tobacco	ICAM1	receptor for common cold	Phase 1 ready, early 2008
Prodigene	Maize	Avidin	Diagnostic use	Available in Sigma catalogue
	Maize	Trypsin	Wound care / insulin manufacture	Available in Sigma catalogue
LSBC (in Ch.11 bankruptcy)	Tobacco	Vaccine	Non-Hodgkin's lymphoma	Phase 1 successful in 2002
	Tobacco	Aprotinin	Non-clinical use	Was in Sigma catalogue in 2005
Arizona State Univ.	Potato	Vaccine	E.Coli	Phase 1
	Potato	Vaccine	Hepatitis «B»	Phase 1
	Potato	Vaccine	Norwalk virus	Phase 1
	Tobacco	Vaccine	Norwalk virus	Phase 1 / 2
Ventria Biosciences	Rice	Lactoferrin	cell culture media	Available from company
	Rice	Lysozyme	For research purposes	Available from company
Biolex	Lemna	Alpha Interferon	Hepatitis «B» & «C» and Cancer	Phase 1
Cobento AS (formerly Cobento Biotech AS)	Arabidopsis	Human Intrinsic Factor	Vitamin B12 deficiency	Approved Coban product launched. Successful 37 patient clinical trial cGMP production certified
	Arabidopsis	Transcobalamin	Diagnostic / research	Available from company
Dow Agrosciences	Plant cell non-nicotine tobacco	Vaccine	Newcastle disease in poultry	USDA Approved in Feb.06
Protalix	Plant cell	Glucocerebrosidase	Gaucher's disease	Phase 3 started Aug 29th,07
Guardian Biosciences	Canola	Edible vaccine	Coccidiosis in poultry	CFIA phase 2
CIGB (Cuba)	Tobacco	Recombinant Monoclonal (Mab)	Purification re-agent in Hep. «B» vaccine	Approved mid 2006 in Cuba
Dr. Yusibov and others	Spinach	Vaccine	Rabies	Phase 1 successful in 2002
Farmacule	Tobacco	Virtonectin	Research use	Available from company mid 2007. Distribution under negotiation
Sembiosys	Safflower	Insulin	Diabetes	Phase 1 trial planned for early 2008
	Safflower	Apolipoprotein AI	Cardiovascular	Phase 1 trial planned for early 2009

Una linea di ricerca particolarmente interessante e promettente è quella di utilizzare le piante per la produzione di sostanze di uso farmaceutico normalmente non prodotti in piante.

La ricerca sta facendo passi da gigante in questo settore, dato l'enorme interesse commerciale e numerose sono le ditte farmaceutiche anche italiane che sono attive in queste ricerche. Queste ricerche sono piuttosto lunghe e complesse, perché una volta ottenuta la pianta necessariamente transgenica esprime con sufficiente livello la proteina di interesse farmaceutico, le proteine così ottenute devono essere sottoposte a saggi biologici secondo rigidi protocolli internazionali.

Numerose sono le proteine di interesse farmaceutico prodotte dalle piante che sono vicine alla commercializzazione avendo già superato alcune delle fasi previste dalla sperimentazione (Tab. 12). Queste proteine, espresse in piante transgeniche di specie diverse come tabacco, mais, riso, patata, spinaci e *Arabidopsis*, sono risultate utili a scopo terapeutico per importanti malattie. Particolarmente interessante risulta la produzione di vaccini: viene trasferito nella pianta il gene per un antigene ad un determinato patogeno, la pianta sintetizza questo antigene e questo a sua volta attiva il sistema immunitario della persona che ha ingerito l'alimento a produrre anticorpi contro lo stesso agente patogeno eventualmente presente. Che la tecnologia funzioni è dimostrata dalla utilizzazione nel febbraio del 2006 negli USA del primo vaccino prodotto in pianta per una malattia dei polli [35].

6. Conclusioni

I progressi tecnologici nella biologia molecolare hanno determinato un'esplosione delle conoscenze sulla variabilità presente nel mondo vegetale e principalmente su come utilizzarla. D'altra parte l'agricoltura sia nei Paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo sta diventando sempre più dipendente dalle innovazioni biologiche, la cui utilizzazione può migliorare notevolmente la produzione agricola. Nuove varietà più ecosostenibili e che diano prodotti nuovi e competitivi, possono essere realizzate solo se c'è un forte impegno scientifico adoperando le tecnologie genetiche e genomiche oggi disponibili.

Riassunto – L'integrazione della genomica con le biotecnologie, con la bioinformatica e con i metodi convenzionali di miglioramento genetico e di mutagenesi ha determinato un considerevole progresso nella valorizzazione delle risorse genetiche vegetali.

La possibilità di identificare e clonare i geni presenti nei genomi ha ampliato enormemente le fonti della variabilità genetica utilizzabile per il miglioramento genetico delle piante. Particolare importanza hanno assunto le specie selvatiche più o meno imparentate con le cv, che sempre più spesso vengono utilizzate nei programmi di breeding anche con l'ausilio di marcatori molecolari associati con caratteri di interesse agronomico. I marcatori molecolari hanno infatti accelerato notevolmente i programmi di miglioramento per gli

aspetti delle resistenze a stress biotici ed abiotici, per gli aspetti della qualità nutrizionale ed anche per caratteri complessi determinati da QTL.

Rilevanti sono poi i progressi ottenuti per la realizzazione di nuovi prodotti industriali ed in particolare farmaceutici.

Il confronto tra i genomi ha permesso inoltre di conoscere le sequenze conservate e ripetute nella specie, tra specie e tra generi, il che ha reso possibile la comprensione delle relazioni filogenetiche e del percorso evolutivo di importanti gruppi di piante.

Sono riportati esempi di applicazione della genomica nei diversi campi della genetica vegetale sopra menzionati.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Carputo D., A. Barone 2005. Ploidy manipulation in potato through sexual hybridization. *Ann. Appl. Biol.*, 146:71-79.
- [2] Carputo D., A. Barone, V. Ferrentino, L. Frusciante, 2002. Miglioramento genetico della patata. In: *Aspetti economici e prospettive della coltivazione della patata in Italia* P. Lombardi (ed.), E.S.I., Napoli, 161-221.
- [3] Daniell H. 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology Journal*, 1, 1071-1079.
- [4] Davies K.M. 2007. Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutation Research*, 622, 122-137.
- [5] De Palma M., S. Grillo, I. Massarelli, A. Costa, G. Balogh, L. Vigh, A. Leone 2008. Regulation of desaturase gene expression, changes in membrane lipid composition and freezing tolerance in potato plants. *Molecular Breeding*, 21, 15-26 (ISSN 1380-3743).
- [6] Frary A, T.C. Nesbitt, A. Frary, S. Grandillo, E. Van der Knaap, B. Cong, J. Liu, J. Meller, R. Elber, K.B. Alpert, S.D. Tanksley, 2000. fw-2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 289, 85-88.
- [7] Fridman E, T. Pleban, D. Zamir, 2000. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4718-4723.
- [8] Gale M.D, K.M. Devos, 1998. Comparative genetics in the grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1971-1974.
- [9] Gao L., H. Xu, 2008. Comparisons of mutation rate variation at genome-wide microsatellites: evolutionary insights from two cultivated rice and their wild relatives. *BMC Evolutionary Biology*, 8:11, doi:10.1186/1471-2148-8-11.
- [10] Gaut B.S., 2001. Patterns of chromosomal duplication in maize and their implications for comparative maps of the grasses. *Genome Res.*, 11, 55-66.
- [11] Grandillo S, S.D. Tanksley, D. Zamir, 2008 (R.K. Varshney and R. Tuberosa eds). Exploitation of natural biodiversity through genomics. In *Genomics Assisted Crop Improvement: Vol I Genomics Approaches and Platforms* R.K. Varshney, R. Tuberosa (eds) Springer, The Netherlands, 121-150.
- [12] Gu Z., L.M. Steinmetz, X. Gu, C. Scharfe, R.W. Davis, Li W-H., 2003. Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature*, 42, 63-66.
- [13] Gur, A., D. Zamir, 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biol*, 2, 245.
- [14] Hammer K. 2003. A paradigm shift in the discipline of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50, 3-10.
- [15] Harjes, C.E. T.R. Rocheford, L. Bai, T.P. Brutnell, C.B. Kandianis, S.G. Sowinski, A.E. Stapleton, R. Vallabhaneni, M. Williams, E.T. Wurtzel, J. Yan, E.S. Buckler, 2008. Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification. *Science* 319 5861, 330-3.
- [16] http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/Arabidopsis_genome_duplication.shtml
- [17] Jeffrey Chen Z. 2007. Genetic and Epigenetic Mechanisms for Gene Expression and Phenotypic Variation in Plant Polyploids. *Annu Rev Plant Biol.*, 58, 377-406.
- [18] Kleter G.A., W.M. van der Krieken, E.J. Kok, D. Bosch, W. Jordi, Gilissen L.J.W.J. 2001. Regulation and exploitation of genetically modified crops. *Nature Biotechnology*, 19, 1105 - 1110.
- [19] Kress W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt, D.H. Janzen. 2005. Use of barcodes to identify flowering plants. *PNAS*. 102, 23, 8369-8374.

- [20] Leone A., S. Grillo, L. Monti, T. Cardi, 2007. Molecular tailoring and boosting of bioactive secondary metabolites in medicinal plants. In: Ranalli P. (ed.) *Improvement of Crop Plants for Industrial Uses*. Heidelberg: Springer, Germany, pp. 471-507.
- [21] Massarelli I., R. Cioffi, G. Batelli, M. De Palma, A. Costa, S. Grillo, A. Leone, 2006. Functional screening of plant stress-related cDNAs by random over-expression in *Escherichia coli*. *Plant Science*, 170: 880-888 52.
- [22] Massarelli I., S. Grillo, A. Costa, A. Leone, 2002. Differential expression of potato calmodulin genes by cold, heat and salt stress. *J.Genet.& Breed.*, 56: 331-338.
- [23] Michelmore R.W. 2003. The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 397-404.
- [24] Monti L. 2004. Nuove strategie nella gestione delle risorse genetiche vegetali in Italia. *Memorie di Scienze Fisiche e Naturali. Rendiconti dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL*, 122°, XXVIII: 219-223.
- [25] Monti L. 2007. La mutagenesi vegetale nell'era post-genomica. *Collana «Scritti e Documenti» dell'Accademia Nazionale delle Scienze detta dei XL*, 40: 259-266.
- [26] Muller H.J., 1925 Why poliploidy is rarer in animals than in plants . *Am. Nat.*, 59: 346-353.
- [27] NCBI GenBank Statistics. 2006. Growth of GenBank. www.ncbi.nlm.nih.gov
- [28] Rao R., 2007. Authentication of the «Annurca» Apple in Agro-food chain by Amplification of Microsatellites Loci. *Food Biotechnology*, 21: 1, 33-43.
- [29] Sonnante G., A.V., Carluccio, A. De Paolis, D. Pignone, 2008. Identification of artichoke SSR markers: molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies. *Genet Resour Crop Evol* DOI 10.1007/s1072-008-9310-5.
- [30] Tanksley S.D., S.R. McCouch, 1997. Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066.
- [31] The European Union Framework 6 Pharma-Planta Consortium. 2005. Molecular Farming for new drugs and vaccines. *EMBO reports* 6(7): 593-599.
- [32] Vision T.J., D.G. Brown, S.D. Tanksley., 2000. The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science* 290:2114-17.
- [33] Yu J., J. Wang, W. Lin, S. Li, H. Li, *et al.*, 2005. The genomes of *Oryza sativa*: A history of duplications. *PLoS Biol*; 3: e 38.
- [34] Zamir D., 2008. Plant breeders go back to nature. *Nature genetics* 40: 269-270.
- [35] Zhao Y, R.W. Hammond, 2005. Development of a candidate vaccine for Newcastle Disease Virus by epitope display in the Cucumber Mosaic Virus capsid protein. *Biotechnol Lett* 27: 375-382.
- [36] Zheng P., W.B., Allen, K. Roesler, M.E. Williams, S. Zhang, J. Li, K. Glassman, J. Ranch, D., D. Nubel, W. Solawetz, D. Bhatramakki, V. Llaca, S. Deschamps, G.Y. Zhong, M.C. Tarczynski, B. Shen, 2008. A phenylalanine in DGAT is a key determinant of oil content and composition in maize. *Nat Genet.* 40(3): 367-72.