



SOI

Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana

Summer School of Floriculture 2015

Tradizione e innovazione nel comparto delle
colture aromatiche e officinali

Sanremo • Albenga 7-11 settembre 2015

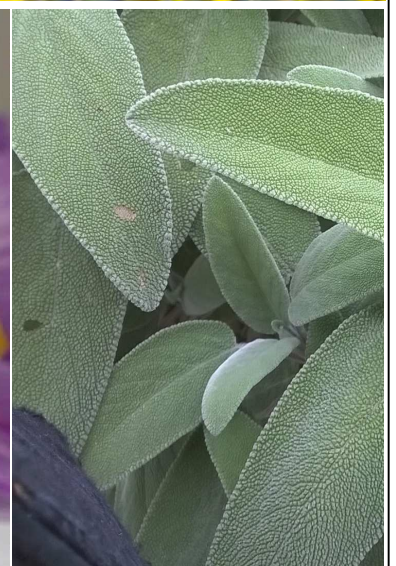
RACCOLTA CONTRIBUTI DEI RELATORI E SCHEDE TEMATICHE

In collaborazione con:

DISAFA Università degli Studi di Torino

CREA FSO Sanremo IRF Sanremo CeRSAA Albenga

CSF Regione Liguria

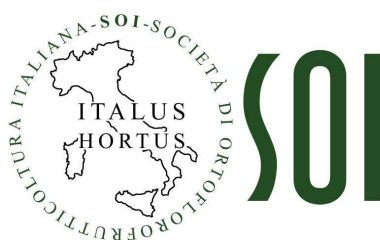


A CURA DI VALENTINA CASABIANCA

SUMMER SCHOOL OF FLORICULTURE 2015

Tradizione e innovazione
nel comparto delle colture aromatiche e officinali
Sanremo • Albenga 7-11 settembre 2015

RACCOLTA CONTRIBUTI DEI RELATORI E SCHEDE TEMATICHE



EDITORE: Società di Ortoflorofruitticoltura Italiana (SOI), Firenze
Direzione e Redazione: SOI Viale delle Idee, 30 – 50019 Sesto Fiorentino (FI); tel. 0554574067
e-mail: segreteria@soihs.org; sito web: www.soihs.it

ISBN: 978-88-940276-7-9

© 2016 by SOI – Firenze

Finito di stampare nel mese di giugno 2016

SUMMER SCHOOL OF FLORICULTURE 2015 · 5° edizione

Tradizione e innovazione nel comparto delle colture aromatiche e officinali

SOI

Società di Ortoflorofrutticoltura Italiana

in collaborazione con:

DISAFA

Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari
(Università degli Studi di Torino)

IRF

Istituto Regionale per la Floricoltura di Sanremo
(Ente strumentale della Regione Liguria)

CREA-FSO

Unità di Ricerca per la Floricoltura e le Specie Ornamentali di Sanremo
(Consiglio per la ricerca e l'analisi dell'economia agraria)

CeRSAA

Centro di Sperimentazione e Assistenza Agricola di Albenga
(Azienda Speciale della Camera di Commercio Industria Artigianato ed Agricoltura Riviera di Liguria)

CSF

Centro Regionale Servizi per la Floricoltura della Regione Liguria

con il patrocinio di:

MiPAAF

Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali

SIROE

Società Italiana per la Ricerca sugli Oli Essenziali

SIF

Società Italiana di Fitochimica

e il contributo di:

Club UNESCO Sanremo

Mercato dei Fiori di Sanremo

COMITATO SCIENTIFICO

Margherita Beruto (Direttore IRF)

Marco Devecchi (Professore Associato DISAFA)

Fiorenzo Gimelli (Funzionario Regione Liguria)

Giovanni Minuto (Direttore CeRSAA)

Barbara Ruffoni (Direttore CREA-FSO e Presidente Sezione Floricoltura e Piante Ornamentali della SOI)

Valentina Scariot (Ricercatore DISAFA)

SEGRETERIA ORGANIZZATIVA

Valentina Casabianca (Università degli Studi di Torino)

Ringraziamenti

Museo Civico di Palazzo Borea d'Olmo di Sanremo

Giardini del Museo Internazionale della Profumeria di Grasse

Azienda Agricola Amori e Aromi di Roberto Raviola

Azienda Agricola Agricotta di Giuseppe Cotta

Azienda Agricola La Vecchia Distilleria di Pietro Guglielmi

Franco Stalla (Progetto "Lavanda Riviera dei Fiori")

Grazia Maria Scarpa (Università degli Studi di Sassari)

INDICE

PRESENTAZIONE DEL CORSO

Comitato Scientifico Summer School of Floriculture	pag.07
<i>Il Tavolo di filiera delle Piante Officinali</i>	
Alberto Manzo	pag.09

CONTESTO DELLE SPECIE AROMATICHE ED OFFICINALI

pag.13

La formazione nel campo delle tecniche erboristiche

Patrizia Rubiolo, Maria Laura Colombo, Carlo Bicchi	pag.15
---	--------

Le piante officinali: uno sguardo alla situazione produttiva in Italia e nel mondo

Andrea Primavera	pag.21
------------------------	--------

Le piante aromatiche e da essenza nella tradizione del ponente ligure e la progressione produttiva della piana di Albenga

Fiorenzo Gimelli	pag.29
------------------------	--------

BIODIVERSITÀ ED ETNOBOTANICA

pag.43

Piante medicinali nella tradizione etnobotanica italiana

Laura Cornara	pag.45
---------------------	--------

La biodiversità e i suoi hotspot in Italia e altrove

Mauro Mariotti	pag.55
----------------------	--------

I prodotti gemmoterapici.

Dalla farmacopea francese al consumatore di oggi

Dario Donno, Maria Gabriella Mellano, Gabriele Loris Beccaro	pag.68
--	--------

LA FILIERA PRODUTTIVA

pag.79

Significato, gestione e valorizzazione delle collezioni vegetali

Claudio Cervelli	pag.81
------------------------	--------

Contributo del miglioramento genetico alla produttività del comparto officinale

Piero Belletti	pag.89
----------------------	--------

Propagazione di piante officinali:

tecniche tradizionali, con particolare riguardo alle specie montane ed alpine

Pietro Fusani	pag. 98
---------------------	---------

Culture *in vitro* di piante officinali

Barbara Ruffoni	pag.107
-----------------------	---------

Molecular pharming:

tecnologie innovative per la produzione di biomolecole in specie vegetali

Laura Bassolino, Barbara Ruffoni	pag.115
--	---------

Tecniche di coltivazione in vaso di piante aromatiche

Lucia Paoletti	pag.125
----------------------	---------

Gestione dell'irrigazione e della concimazione

delle specie aromatiche coltivate in vaso

Alberto Pardossi, Pasquale Restuccia, Luca Incrocci	pag.134
---	---------

DIFESA E PRODUZIONE

pag.145

Problematiche entomologiche delle specie aromatiche officinali

(sintomatologia, diagnosi, difesa)

Aldo Pollini	pag.147
--------------------	---------

Malattie da virus e fitoplasmi delle specie aromatiche:

sintomatologia, diagnosi, difesa

Mariagrazia Bellardi	pag.152
----------------------------	---------

Avversità fungine e batteriche delle specie aromatiche coltivate in vaso:

evoluzione ed esperienze di difesa

Patrizia Martini, Giorgio Bozzano, Anna Maria Crotti, Marco Odasso, Laura Repetto, Stefano Rapetti	pag.158
---	---------

IMPIEGHI ORNAMENTALI	pag.169
Il valore delle specie officinali nella progettazione del verde pubblico e privato	
Marco Devecchi, Valentina Scariot	pag.171
Il giardino domestico romano a <i>Augusta Bagiennorum</i>	
Rosanna Caramiello	pag.180
Il Giardino delle Essenze dei Castelli di Lagnasco (Cuneo)	
Maria Laura Colombo, Patrizia Rubiolo, Carlo Bicchi	pag.190
APPLICAZIONI INDUSTRIALI	pag.195
Olii essenziali: estrazione, caratterizzazione e usi	
Guido Flamini	pag.197
Composti bioattivi da specie di <i>Salvia</i> di interesse ornamentale:	
l'esperienza dei Progetti EU-ALCOTRA in Liguria (Italia)	
Angela Bisio, Anita Parricchi, Giovanni Romussi, Nunziatina De Tommasi	pag.205
ESPERIENZE DAL MONDO PRODUTTIVO	pag.219
(fotogallery)	pag.221
SCHEDE TEMATICHE	pag.223
<i>Artemisia dracunculus</i> L.	
(a cura di Sauro Biffi)	pag.225
<i>Borago officinalis</i> L.	
(a cura di Lucia Paoletti)	pag.229
<i>Crocus sativus</i> L.	
(a cura di Grazia Maria Scarpa)	pag.233
<i>Helichrysum italicum</i> (Roth) Don	
(a cura di Claudio Cervelli)	pag.238
<i>Hypericum perforatum</i> L.	
(a cura di Mariagrazia Bellardi)	pag.243
<i>Lavandula angustifolia</i> Miller e <i>Lavandula hybrida</i> Revenchon	
(a cura di Valentina Scariot e Sonia Demasi)	pag.248
<i>Linum usitatissimum</i> L.	
(a cura di Rosanna Caramiello)	pag.253
<i>Matricaria chamomilla</i> L.	
(a cura di Maria Laura Colombo e Patrizia Rubiolo)	pag.257
<i>Melissa officinalis</i> L.	
(a cura di Pietro Fusani)	pag.262
<i>Mentha x piperita</i> L.	
(a cura di Patrizia Rubiolo e Maria Laura Colombo)	pag.265
<i>Origanum vulgare</i> L.	
(a cura di Mariagrazia Bellardi)	pag.270
<i>Passiflora incarnata</i> L.	
(a cura di Andrea Primavera)	pag.275
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	
(a cura di Claudio Cervelli)	pag.278
<i>Salvia officinalis</i> L.	
(a cura di Anna Crotti e Giorgio Bozzano)	pag.283

Contributo del miglioramento genetico alla produttività del comparto officinale

Piero Belletti

*Università degli Studi di Torino – Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari -
Genetica Agraria, Largo P. Braccini 2, 10095 Grugliasco
piero.belletti@unito.it*

Riassunto

L'utilizzazione di piante officinali è in crescita e coinvolge soprattutto specie spontanee, la cui raccolta è spesso causa di fenomeni di erosione genetica e alterazione degli habitat. La loro coltivazione rappresenta una valida alternativa, la quale consente anche di superare altre problematiche connesse alla raccolta spontanea. La presenza di un elevato livello di variabilità genetica consente efficacemente l'adozione di tecniche di *breeding* di tipo tradizionale, fondamentalmente basate sulla selezione. Anche le tecniche di trasformazione genetica vengono applicate in modo sempre più massiccio al settore delle piante officinali, così come è sempre più diffusa la tecnica del *Medical Molecular Farming*, che prevede la sintesi *in vitro* di principi attivi a partire da linee cellulari geneticamente modificate.

Parole chiave: propagazione delle piante, variabilità genetica, selezione, colture *in vitro*, trasformazione genetica

Contribution of breeding to medicinal and aromatic plants productivity

Abstract

The use of herbal medicine and aromatic plants is increasing all over the world and involves mainly plants growing in the wild. This gives rise to a growing concern about loss of genetic diversity as well as environmental degradation. The cultivation of medicinal and aromatic plants is a valid long-term alternative, that opens up the possibility to solve even other problems that are inherent to spontaneous harvest. Furthermore, the huge amount of genetic variability still present in wild species or subjected to a very limited amount of domestication makes the breeding techniques highly efficient in improving the traits of the plants of interest. Traditional breeding methods could be efficiently applied, according to the propagation system of the species (vegetative propagation, selfing, cross-pollination). Most of them are based on selection of best individuals, chosen on phenotypic basis or according to the results of progeny tests. In order to enlarge genetic variability and/or combine in a single genotype useful traits present in different individuals, the selection can be preceded by controlled crosses. Molecular Marker Assisted Selection is being used increasingly and *in vitro* tissue culture can be used both for plant micro-propagation and genetically improvement of plants, through exploitation of somaclonal variability, haplo-diploid production, embryo rescue, somatic cell fusion, artificial seed production. Furthermore, there is a long history of experimental and commercial production of secondary, high-value metabolites as drugs, fragrances, pigments, food additive in plant cell suspensions cultivated *in vitro*. The direct manipulation of DNA sequences to alter gene expression in medicinal and aromatic plants is a sector in wide expansion and involves traits controlled by one or a small number of genes, such as enhanced metabolites production, parasites resistance, herbicide tolerance.

Medical Molecular Farming is also increasing its importance and consists of *in vitro* synthesis of metabolites from cellular lines subjected to genetic transformation. The adoption of biotechnological tools in breeding of plants whose main attraction is due to a high “natural” status could, however, give rise to problems in popular acceptance.

Keywords: plant propagation, genetic variability, selection, *in vitro* culture, genetic transformation

Introduzione

L'utilizzazione di piante officinali è in forte crescita e coinvolge non meno di 50.000 specie (Schipmann et al. 2002), di cui la maggior parte cresce spontanea allo stato selvatico: in Europa si stima che solo il 10% delle specie utilizzate a fini farmacologici sia oggetto di coltivazione (Edwards 2004, Vines 2004). La raccolta di piante spontanee è causa di fenomeni di erosione genetica e, a volte, anche di alterazione degli habitat; nei casi più gravi si rischia l'estinzione di popolazioni locali. Esempi di specie che, in varie parti del mondo, sono minacciate da una raccolta eccessiva ed incontrollata sono uva ursina (*Arctostaphylos uva-ursa*), kava (*Piper menthyschum*), liquirizia (*Glycyrrhiza glabra*) (Canter et al. 2005). La coltivazione delle specie officinali rappresenta una valida alternativa alla raccolta in natura, che consente anche di superare altre problematiche: errori di identificazione tassonomica, elevati livelli di variabilità a livello sia fenotipico che genotipico, controllo sulla presenza di composti tossici e contaminanti, disponibilità continua e regolare nel tempo, standardizzazione qualitativa, possibilità di certificazione (ad esempio nel caso dell'agricoltura biologica). Inoltre, la coltivazione in ambiente sia pure parzialmente controllato può, da un lato, migliorare le performance produttive delle piante e, dall'altro, sfruttare la grande variabilità genetica ancora presente nelle specie di interesse officinale. Proprio sulla base di tale elevato livello di variabilità genetica, le tecniche di miglioramento genetico di tipo tradizionale (basate sulla selezione) possono fornire risultati di notevole interesse. A tale scopo è necessario prioritariamente acquisire informazioni sulle caratteristiche botaniche e biologiche di specie spesso poco conosciute, quali ad esempio il sistema riproduttivo (autogamo oppure allogamo), la propensione alla moltiplicazione vegetativa, i sistemi di trasferimento del polline, l'eventuale presenza di meccanismi di auto incompatibilità, le caratteristiche dei semi (esigenze per la germinazione, eventuale presenza di fenomeni di dormienza, modalità ottimali di conservazione), ecc.

Il miglioramento genetico e la costituzione varietale

Le piante possono propagarsi mediante due modalità: con la moltiplicazione vegetativa (o agamica) si preleva una parte (ad esempio la parte apicale di un ramo) da un individuo preesistente e si opera in modo che tale struttura ricostituisca le parti mancanti (l'apparato radicale, nell'esempio precedente), formando una pianta completa. Questa, ovviamente, presenterà lo stesso genotipo dell'individuo da cui è stato prelevato il ramo. Si viene così a costituire un clone: insieme di individui geneticamente identici perché ottenuti propagando vegetativamente un unico progenitore. Con la riproduzione sessuale, invece, si ricorre al seme, cioè la struttura che deriva dalla fusione di due cellule specializzate (gameti, a contenuto cromosomico dimezzato), con conseguente formazione dapprima di uno zigote e poi di un embrione. Con la riproduzione sessuale, fatte salve alcune eccezioni, si ottiene una progenie geneticamente variabile, a seguito del riassortimento dei cromosomi materni e paterni e di

eventi di crossing-over che avvengono durante la divisione meiotica il cui risultato è la formazione dei gameti.

I metodi di miglioramento genetico e costituzione varietale sono diversi a seconda del sistema di propagazione adottato dalla specie su cui si opera.

Specie a propagazione vegetativa

Nel caso di specie che si propagano (obbligatoriamente o perché ritenuto conveniente dall'uomo) per via vegetativa, le varietà sono generalmente costituite da uno o più cloni. Nel primo caso si massimizza la produzione potenziale, dal momento che la scelta cade ovviamente sul clone più produttivo: nel caso invece di un miscuglio di cloni si incrementa l'adattabilità del materiale, dovuta alla presenza di un livello, sia pur modesto, di variabilità genetica. Poiché gli individui che vengono propagati agamicamente sono, di solito, caratterizzati da un elevato livello di eterozigosi, la loro eventuale riproduzione per seme origina una discendenza caratterizzata da una elevata variabilità, dovuta a fenomeni di ricombinazione e segregazione. Tale tecnica può quindi essere utilizzata per identificare, nella progenie, genotipi di particolare interesse, da propagare poi nuovamente per via vegetativa.

Un altro metodo di miglioramento genetico applicabile a queste specie è la mutagenesi, cioè l'induzione di mutazioni genetiche, cioè modificazioni stabili a livello del materiale genetico. Naturalmente questo processo non è controllabile a priori e occorrerà verificare solo a mutazione avvenuta se è comparso qualche carattere di interesse. Con tale tecnica Fang et al. (2005), ad esempio, hanno ottenuto nuovi cloni di *Mentha haplocalyx* caratterizzati da un maggior contenuto in oli volatili, soprattutto mentolo.

Specie prevalentemente autogame

Le specie autogame, a causa del loro sistema riproduttivo basato prevalentemente sull'autofecondazione, presentano un elevato livello di omozigosi e le loro popolazioni sono di solito costituite da un insieme di linee pure, laddove per linea pura si intende la progenie che si ottiene autofecondando un progenitore completamente omozigote: è evidente come gli individui che costituiscono una linea pura sono tra loro geneticamente identici.

Il più semplice intervento di miglioramento genetico in questo caso è rappresentato dalla selezione, la quale può essere applicata secondo varie modalità: la più semplice è la selezione massale, con la quale ci si limita a scegliere gli individui che meglio rispondono alle nostre esigenze (selezione positiva), oppure ad eliminare dalla popolazione gli individui palesemente scadenti (selezione negativa).

Più complesso è il metodo che prevede l'identificazione delle migliori linee pure, reperite direttamente nelle popolazioni locali e originatesi e diversificatesi a seguito di sporadici incroci che possono, con frequenza più o meno bassa, coinvolgere anche queste specie. Così come già visto per le varietà clonali, anche nel caso delle specie autogame potremo avere varietà monogenotipiche (costituite da una sola linea pura e caratterizzate da una maggior produttività potenziale) oppure poligenotipiche (miscuglio di linee pure, dotate di una miglior adattabilità).

Le varietà possono altresì derivare da incroci controllati, ad esempio tra linee pure che presentano ciascuna caratteri di pregio, che sarebbe utile poter riunire in un unico genotipo. L'incrocio genera un certo livello di eterozigosi, che però, dopo alcune generazioni di autofecondazione, tenderà a ridursi fino ad annullarsi: a questo punto la popolazione sarà costituita da un certo numero di linee pure e si potrà procedere con gli interventi selettivi di cui sopra.

Specie prevalentemente allogame

Nelle specie allogame prevale l'eterozigosi e la struttura genetica delle popolazioni è determinata da fenomeni di segregazione e ricombinazione: in linea teorica si instaura un equilibrio tra le frequenze alleliche e quelle genotipiche (legge di Hardy-Weinberg). La tecnica più semplice di miglioramento genetico in questo caso consiste nella costituzione di popolazioni a libera impollinazione, preceduta da selezione degli individui da conservare. Anche in questo caso la selezione può essere più o meno intensa e prevedere solo la conservazione degli individui di maggior interesse oppure l'eliminazione di quelli più scadenti. Queste popolazioni presentano un modesto livello di uniformità genetica e di stabilità nelle generazioni successive, anche se la base genetica relativamente ampia consente loro di solito un buon livello di adattamento alle condizioni ambientali di coltivazione.

Le cultivar sintetiche rappresentano un ulteriore affinamento e sono costituite dalla progenie, ottenuta per libera impollinazione, di progenitori selezionati non solo su base fenotipica, ma anche in funzione della loro capacità di trasmettere alla progenie caratteristiche di pregio (attitudine alla combinazione).

Mediante queste tecniche è stato possibile ottenere consistenti miglioramenti in alcune caratteristiche essenziali delle piante officinali: ad esempio la resistenza in *Hypericum perforatum* agli attacchi di *Colletotrichum gloeosporoides* (Gaudin et al. 2002) oppure varietà di *Artemisia umbelliformis* a portamento eretto, più produttive e prive o con ridotta presenza di thujone, sostanza con effetti neurotossici (Carlen et al. 2009).

Infine, occorre ricordare che molte specie, soprattutto allogame, traggono vantaggio dalla costituzione di ibridi F_1 , previa accurata scelta dei genitori in base alla loro già citata attitudine alla combinazione. In linea generale, gli ibridi si ottengono incrociando artificialmente individui appartenenti a linee pure diverse, o linee inbred nel caso di specie allogame, nel qual caso l'omozigosi si raggiunge a seguito di alcune generazioni di autofecondazione artificiale. In questo modo è possibile massimizzare l'eterosi, che è il principale fattore responsabile dell'elevato vigore presentato dagli ibridi F_1 . Da ricordare anche un altro aspetto di interesse degli ibridi, e cioè la loro elevata omogeneità, soprattutto nel caso di ibridi a due vie, cioè costituiti direttamente dall'incrocio tra due linee pure o inbred. Naturalmente, la natura stessa degli individui ibridi impedisce al coltivatore di reimpiegare i semi ottenuti (i quali andrebbero incontro al fenomeno della segregazione, con conseguente decadimento qualitativo e aumento dell'eterogeneità), costringendolo ad acquistare ogni anno nuovo materiale sementiero. A titolo di esempio si possono citare ibridi F_1 di *Artemisia annua* caratterizzati da un più elevato contenuto di artemisinina, prodotto a comprovata efficacia antimalarica (da 0.10-0.40% sul peso secco delle linee parentali a 1.38% nell'ibrido) (Simonnet et al 2008, Townsend et al. 2013), oppure ibridi di *Thymus vulgaris* che producono il 4.9% di oli essenziali (pari a 191 l/ha) contro valori di 2.9% (97 l/ha) delle popolazioni naturali (Vouillamoz et al 2011).

Tecniche innovative

Con la scoperta, avvenuta negli ultimi decenni del secolo scorso, di tecniche di analisi e manipolazione del materiale genetico (DNA in particolare), anche il miglioramento genetico ha visto rivoluzionare i propri metodi.

Selezione Assistita da Marcatori

Una delle strategie che rappresenta una sorta di punto di incontro tra interventi di tipo tradizionale e innovativo è la *Selezione Assistita da Marcatori* o MAS (Arús and Moreno-González 1993). Si tratta di individuare specifiche sequenze di DNA (marcatori molecolari) che

sono strettamente correlate a caratteri di interesse, soprattutto di tipo quantitativo. Selezionando per i marcatori, più facili e precoci da identificare, si seleziona quindi automaticamente anche per il carattere che si vuole migliorare. Con questa tecnica sono stati ottenuti considerevoli risultati anche nel settore officinale: ad esempio maggior contenuto di sintetasi responsabili della produzione di cannabinoidi in *Cannabis* (Pacífico et al. 2006).

Le colture in vitro

Anche le colture *in vitro* sono una scoperta relativamente recente, risalendo all'incirca alla metà del secolo scorso. Si tratta della coltivazione di individui o, più frequentemente, di parti di essi, su substrato artificiale e in condizioni ambientali controllate ed asettiche (Pierik 1993). Esse si basano sul concetto di totipotenza, che è una prerogativa delle cellule vegetali e che prevede la differenziazione tardiva e la crescita illimitata; ne consegue la possibilità di ricostituire una pianta completa a partire da una piccola parte di un individuo preesistente, in casi limite da una sola cellula (Thorpe 2012). Le colture *in vitro* vengono prevalentemente utilizzate come tecnica di micropropagazione: in questo caso si coltivano solitamente pezzi di fusto contenenti una gemma, i quali nel giro di poche settimane, producono un germoglio nel quale il numero di gemme arriva fino a 5-6: ciascuna di esse viene isolata e rimessa in coltura per un numero variabile di cicli. Così, nell'arco di pochi mesi, è possibile ottenere un numero elevatissimo di piante, che risulteranno tutte perfettamente uguali dal punto di vista genetico: esse, infatti, costituiscono un clone. Tale tecnica è ampiamente utilizzata in agricoltura, in quanto consente di ottenere, in tempi relativamente brevi, numeri altissimi di piante a partire da un unico individuo dalle ottime caratteristiche.

Nel settore officinale la micropropagazione è utilizzata da molti anni: i casi di maggior interesse applicativo e di più antica utilizzazione riguardano *Catharanthus roseus*, *Chlorophytum borovilianum*, *Datura metel*, *Bacopa monnieri*, *Withania somnifera*, *Hoslundia opposita* (Mousumi et al. 2006, Prakash and Van Staden, 2007, Sarita and Naidu 2007).

Le colture *in vitro* possono inoltre essere utilizzate per svariati altri obiettivi. Uno di questi riguarda il risanamento da infezioni virali. È infatti noto da tempo che i virus di solito non invadono le cellule meristematiche, probabilmente a causa dell'elevato tasso di replicazione di queste ultime. Prelevando una piccola porzione di apice meristematico e rigenerando *in vitro* una pianta intera è quindi possibile ottenere un individuo risanato, anche se resta la possibilità di nuove infezioni (Wheaters and Calavan 1959). In campo officinale, il risanamento via coltura *in vitro* di apici meristematici è stato ottenuto, ad esempio, in *Rhemannia glutinosa* (Shao et al. 2008) e *Lilium brownii* (Shao et al. 2010).

Mediante le colture *in vitro* è anche possibile ottenere individui perfettamente omozigoti, in alternativa al lungo e non sempre possibile, a causa dell'insorgenza di fenomeni di depressione da *inbreeding*, processo che prevede ripetute autofecondazioni (Hadziabdic et al. 2011). Si tratta di coltivare *in vitro* delle cellule aploidi, quali ad esempio i granuli pollinici, ed indurne, mediante stimoli di natura ambientale ed ormonale, la moltiplicazione cellulare. Si produrrà così una pianta aploide, poiché non vi è stata alcuna fusione gametica. La piantina aploide è molto delicata e debole, tuttavia è possibile fare in modo che riacquisti il normale livello di ploidia. Si agisce con prodotti, (di cui il più usato è la colchicina, un alcaloide che si ricava dal *Colchicum autumnalis*) che, durante la mitosi, interferiscono con la sintesi delle fibrille del fuso mitotico e impediscono la divisione cellulare ma non la replicazione dei cromosomi. Si otterranno perciò cellule nuovamente diploidi, con coppie di cromosomi omologhi perfettamente identici, in quanto originatisi l'uno per replicazione dell'altro. Di conseguenza tali cellule saranno omozigoti a tutti i geni. Dalle cellule diploidizzate è poi possibile ottenere delle piante intere, le

quali, una volta adattate alla crescita in condizioni naturali di campo, potranno costituire il punto di partenza per la produzione di ibridi F₁.

Altri settori nei quali le colture *in vitro* possono fornire utili contributi di tipo metodologico sono l'utilizzazione della variabilità soma-clonale, che si origina a seguito di processi di sdifferenziazione e successiva redifferenziazione cellulare indotte per via ormonale (Evans 1989), l'embriocoltura, in grado ad esempio di superare l'incompatibilità embrione-endosperma che spesso causa la morte di ibridi interspecifici (Bridgen 1994), l'ibridazione citoplasmatica, cioè la fusione di due protoplasti appartenenti a specie diverse e sessualmente incompatibili (Constabel 1976), la produzione di semi artificiali (Ravi and Anand, 2012).

Infine, sta assumendo sempre maggiore importanza la possibilità di ottenere metaboliti direttamente da espianti coltivati *in vitro*. I prodotti ottenibili attraverso questa tecnica sono numerosi ed appartenenti a svariate categorie biochimiche: alcaloidi, terpenoidi, steroidi, saponine, fenoli, flavonoidi e così via. Tra i casi di maggior interesse industriale e di utilizzazione ormai consolidata possiamo citare il taxolo da sospensioni cellulari di *Taxus* spp. (Wu et al. 2001), morfina e codeina da callo (tessuto morfologicamente indifferenziato) di *Papaver somniferum* (Siah and Doran 1991), ginsenoidi da radici di *Panax ginseng* (Srivastava and Srivastava 2007), berberina (alcaloide antibatterico) da colture cellulari di *Coptis japonica*, *Thalictrum* spp e *Berberis* spp. (Dubey et al. 2004), terpenoidi da gemme di *Mentha arvensis* (Phatak and Heble 2002), camptotecina da callo di *Nothapodytes foetida* (Thengane et al. 2003).

La trasformazione genetica

La trasformazione genetica, o tecnologia del DNA ricombinante, è un metodo di miglioramento genetico messo a punto negli anni '80 del secolo scorso: i primi esperimenti utilizzarono, come pianta modello, il tabacco (An et al. 1986). Le principali prerogative di questa tecnica sono il trasferimento "mirato" del o dei geni che controllano il carattere sul quale si intende intervenire ed il superamento delle barriere di incompatibilità sessuale: grazie all'universalità del codice genetico è infatti possibile trasferire materiale genetico tra specie appartenenti addirittura a regni diversi. Come detto, la maggior parte delle operazioni di trasformazione genetica riguarda l'inserimento di un gene proveniente da un'altra specie: questo gene può indurre la sintesi di sostanze naturalmente non prodotte dalla specie oggetto di intervento. Tali sostanze possono essere, ad esempio, tossine letali per alcuni gruppi di insetti parassiti, enzimi che degradano la parete cellulare di funghi patogeni, enzimi che inibiscono l'attività di principi attivi a funzione erbicida, conferendo così alla pianta trasformata la capacità di tollerare il relativo trattamento. In altri casi, tuttavia, è possibile ottenere la sintesi di prodotti già presenti nella pianta da migliorare, però in forme molecolari diverse, a volte funzionali (enzimi che rappresentano il bersaglio dell'erbicida glifosate e che dopo la trasformazione non vengono più danneggiati), altre no (enzimi che controllano il processo di fioritura e la cui modifica può indurre la sterilità della pianta). Ricordiamo ancora la sovraespressione di caratteri di interesse, quali ad esempio principi attivi, che si può ottenere introducendo ulteriori copie di un gene già presente nella specie su cui si interviene oppure sostituendo quest'ultimo con un gene più efficiente, ma presente in una specie diversa. La trasformazione genetica può anche silenziare un gene, impedendo così la produzione di sostanze il cui effetto è indesiderato (ad esempio allergeni, enzimi che accelerano la marcescenza dei frutti, sostanze tossiche).

Il trasferimento del materiale può essere effettuato in modo diretto (tecniche di biobalastica o elettroporazione) oppure mediato da un vettore, tra i quali il più comune è *Agrobacterium tumefaciens* (Ma and Chen 2005).

Sono ormai numerosi gli esempi di *Piante Geneticamente Modificate* (PGM) nel settore officinale. Tra gli esempi più significativi possiamo citare la menta (*Mentha* spp), in cui è stata indotta la sovraespressione dei geni che controllano la sintesi di precursori di oli essenziali nei tricomi e l'induzione di resistenza a funghi parassiti (produzione di proteine inibitrici lo sviluppo di funghi, quali ad esempio l'osmotina da tabacco contro *Verticillium* spp.) (Veronese et al. 2001). In ginseng (*Panax ginseng*) è stato inserito il gene che codifica per l'enzima fosfinotricina-acetiltransferase e conferisce tolleranza all'erbicida glufosinate ammonio (Choi et al. 2003). Nel ginseng americano (*Panax quinquefolium*) sono stati inseriti geni provenienti da riso che codificano per chitinasi con azione antifungina (Chen and Punja 2002).

Infine ricordiamo la possibilità di costituire linee cellulari geneticamente modificate, da mantenere *in vitro* e da adibire alla produzione di metaboliti di particolare interesse, utilizzando la tecnica che già nel 1981 portò alla produzione su larga scala di insulina umana in linee transgeniche del batterio *Escherichia coli* (Goeddel et al. 1979) e che è nota come *Medical Molecular Farming*. Le cellule modificate possono derivare da batteri (sistema economico e flessibile, ma impossibilità di ottenere proteine che necessitano di modificazioni post-traduzionali, quali ad esempio glicosilazioni), lieviti (produttività maggiore, ma ancora problemi per le modificazioni post-traduzionali), cellule di mammiferi (ottimo livello qualitativo ma costi molto elevati e rischi di trasmissione di patogeni attraverso il prodotto), cellule di piante (nessun rischio di contaminazione, modificazioni post-traduzionali molto efficienti, minori costi di produzione, possibilità di accumulare i prodotti di interesse in specifiche parti della pianta, quali l'endosperma del seme, da cui l'estrazione è semplice e garantisce elevati livelli di purezza, possibilità di combinare nello stesso organismo geni di diversa origine che controllano fasi successive della stessa via metabolica, aumentando l'efficienza della sintesi) (Rossi 2015). Anche in questo caso gli esempi che si possono fare sono ormai numerosissimi: citiamo, tra i più importanti, la proteina C (anticoagulante) e la somatropina (ormone della crescita) in linee cellulari di tabacco geneticamente modificate, la lattoferrina in patata, l'aprotinina (inibitore della tripsina: farmaco antirigetto) in mais, l'interferone in riso, tabacco, rapa (Daniel et al. 2001).

Prospettive future

Il settore delle piante officinali presenta ottime potenzialità future: è infatti probabile che l'interesse per prodotti farmaceutici, cosmetici, ecc. di origine percepita come naturale sia destinata a crescere. La loro coltivazione, anche se può rendere meno evidente tale aspetto "naturalistico", è tuttavia in grado di limitare possibili impatti negativi sull'ambiente di una raccolta eccessiva e deregolamentata. Poiché, nella maggior parte dei casi, si tratta di specie spontanee o comunque sottoposte a modesti interventi di domesticazione, la grande variabilità genetica ancora presente in esse rende potenzialmente efficaci interventi anche limitati di miglioramento genetico. A fianco delle tecniche tradizionali di breeding, si stanno diffondendo strategie di tipo innovativo, che prevedono manipolazioni genetiche di tipo ingegneristico. La loro utilizzazione potrebbe creare qualche problema di accettazione da parte dell'opinione pubblica: occorre tuttavia valutare la situazione caso per caso, senza eccedere né in pregiudiziali e acritiche ostilità, né in una totale fiducia che porti a sottovalutare i possibili, e potenzialmente gravissimi, effetti negativi.

Bibliografia

- An G., Watson B.D., Chiang C.C., 1986. *Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and Arabidopsis thaliana Using a Binary Ti Vector System*. Plant Physiology, 81: 301-305.
- Arús P., Moreno-González J., 1993. *Marker-assisted selection*. In: M.D. Hayward, N.O. Bosemark, T. Romagosa. M. Cerezo eds., *Plant Breeding Principles and prospects*, Springer Netherlands (Dordrecht): 314-331.
- Bridgen M.P., 1994. *A review of plant embryo culture*. HortScience, 29: 1243-1246.
- Canter P.H., Thomas H., Ernst E., 2005. *Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology*. Trends in Biotechnology, 23: 180-185.
- Carlen C., Vouillamoz J., Baroffio C., Simonnet X., Quennoz M., 2009. *Genetic resources, conservation and breeding*. Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Permanent Committee on Breeding and Cultivation of Medicinal Plants (Neunkirchen am Brand, Germany), pp. 52.
- Chen W.P., Punja Z.K., 2002. *Agrobacterium-mediated transformation of American ginseng with a rice chitinase gene*. Plant Cell Report, 20: 1039-1045.
- Choi Y.E., Jeong J.H., In J.K., Yang D.C., 2003. *Production of herbicide-resistant transgenic Panax ginseng through the introduction of the phosphinothricin acetyl transferase gene and successful soil transfer*. Plant Cell Report, 21: 563-568.
- Constabel F., 1976. *Somatic hybridization in higher plants*. In vitro, 12: 743-748.
- Daniel H., Streatfield S.J., Wycoff K., 2001. *Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants*. Trends in Plant Sciences, 6: 219-226.
- Dubey N.K., Kumar R., Tripathi P., 2004. *Global promotion of herbal medicine: Indian opportunity*. Current Science, 80: 37-41.
- Edwards R., 2004. *No remedy in sight for herbal ransack*. New Science, 181: 10-11.
- Evans D.A., 1989. *Somaclonal variation: genetic basis and breeding applications*. Trends in Genetics, 5: 46-50.
- Fang X.Z., Gao S.L., Zhao M.H., 2005. *The identification of agronomic characteristics and the content determination of volatile oil among induced lines of Mentha haplocalyx Briq*. Pharmaceutical Biotechnology, 12: 93-97.
- Gaudin M., Simonnet X., Debrunner N., Ryser A., 2002. *Breeding for a Hypericum perforatum L. variety both productive and Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) tolerant*. Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, 9: 107-120.
- Goeddel D.G., Kleid D.V., Bolivar F., Heyneker H.L., Yansura D.G., Crea R., Hirose T., Kraszewski A., Itakura K., Riggs A.D., 1979. *Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin*. Proceedings of the National Academy of Science USA, 76: 106-110.
- Hadziabzic D., Wadl P.A., Reed S.M., 2010. *Haploid Cultures*. In: R.N. Trigiano and Grey D.J. eds, Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology, CRC Press (Boca Raton, USA): 385-396.
- Ma H., Chen G., 2005. *Gene Transfer Technique*. Nature and Science, 3: 25-31.
- Mousumi D., Malik C.P., Bisen P.S., 2006. *Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines*. Current Pharmacological Biotechnology, 7: 33-49.
- Pacifico D., Miselli F., Micheler M., Carboni A., Ranalli P., Mandolino G., 2006. *Genetics and marker-assisted selection of the chemotype in Cannabis sativa L*. Molecular Breeding, 17: 257-268.
- Phatak S.V., Heble M.R., 2002. *Organogenesis and terpenoid synthesis in Mentha arvensis*. Fitoterapia, 73: 32-39.
- Pierik R.L.M., 1993. *In vitro culture of higher plants*. Kluwer Academic Publisher (Dordrecht), pp. 353.
- Prakash S., Van Staden J., 2007. *Micropropagation of Hoslundia opposita Vahl, a valuable medicinal plant*. South African Journal of Botany, 73: 60-63.
- Ravi D., Anand P., 2012. *Productions and applications of artificial seeds: a review*. International Research Journal of Biological Sciences, 1: 74-78.
- Rossi L., 2015. *Piante come bioreattori per la produzione di molecole ad interesse medico o farmaceutico*. Scienza Attiva, ed. spec. 2014/2015: 1-30.
- Sarita K.V., Naidu C.V., 2007. *In vitro flowering of Whitania somnifera Dunal, an important antitumor medicinal plant*. Plan Science, 172: 847-851.

- Shao C.Y., Gao S.L., Chen F., Zhang X.X., Ren B., 2008. *Virus-free culture and rapid propagation of Rehmannia glutinosa Libosch.* Pharmaceutical Biotechnology, 4: 258-261.
- Shao Z.L., Gao S.L., Huang H.P., Ji X., Ma L., 2010. *Virus-free culture and rapid propagation of Lilium spp.* Pharmaceutical Biotechnology, 17: 240-243.
- Schipmann U., Leaman D.J., Cunningham A.B., 2002. *Impact of cultivation and gathering of medicinal plants on biodiversity: global trends and issues.* In: FAO ed., *Biodiversity and the Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries*, FAO (Rome): 1-21.
- Siah C.L., Doran P.M., 1991. *Enhanced codeine and morphine production in suspended Papaver somniferum cultures after removal of exogenous hormones.* Plant Cell Reports, 10: 349-353.
- Simonnet X., Quennoz M., Carlen C., 2008. *New Artemisia annua hybrids with high artemisinin content.* Acta Horticulturae, 769: 371-373.
- Srivastava S., Svivastava A.K., 2007. *Haute root culture for mass-production of high-value secondary metabolites.* Critical Reviews in Biotechnology, 27: 29-43.
- Thengane S.R., Kulkarni D.K., Shrikhande V.A., Joshi S.P., Sonawane K.B., Krishnamurthy K.V., 2003. *Influence of medium composition on callus induction and camptothecin(s) accumulation in Nothapodytes foetida.* Plant Cell Tissue Organ Culture 72: 247-251.
- Thorpe T.A., 2012. *History of plant tissue culture.* In: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo eds., *Plant cell culture protocols*, Springer Science (Dordrecht): 9-27.
- Townsend T., Segura V., Chigeza G., Penfield T., Rae A., Harvey D., Bowles D., Graham I.A., 2013. *The use of combining ability analysis to identify elite parents for Artemisia annua F₁ hybrid production.* PLoS ONE, 8: e61989. doi:10.1371/journal.pone.0061989.
- Veronese P., Li X., Niu X., Weller S.C., Bressan R.A., Hasegawa P.M., 2001. *Bioengineering mint crop improvement.* Plant Cell Tissue and Organ Culture, 64: 133-134.
- Vines G., 2004. *Herbal harvests with a future: towards sustainable sources for medicinal plants.* Plantlife International (Salisbury, UK), pp. 12.
- Vouillamoz J.F., Schaller M., Rossinelli M., Carron C.A., Carlen C., 2011. *"Varico 3", nouvel hybride de thym (Thymus vulgaris L.) pour la production en Suisse.* Revue suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture, 43: 370–376.
- Wheaters L.G., Calavan E.C., 1959. *Nucellar embryony - a means of freeing citrus clones of viruses.* In J.M. Wallace ed, *Citrus Virus Diseases.* University of California, Division of Agricultural Science (Berkeley): 197-202.
- Wu J., Wang C., Mei X., 2001. *Stimulation of taxol production and excretion in Taxus spp. cell cultures by rare earth chemical lanthanum.* Journal of Biotechnology, 85: 67-73.