



## In questo numero: **BIODIVERSITÀ IN AGRICOLTURA**



18 Varietà da conservazione in Lombardia: la Cipolla Rossa di Breme



34 Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale di interesse per l'agricoltura



49 L'approccio del Sud est Asiatico alla governance delle biotecnologie agricole



26 Erba medica: confronto tra varietà di recente costituzione nella pianura irrigua del nord Italia



43 L'attività sementiera in Sardegna



53 I mais della Garfagnana: valorizzazione del prodotto e del territorio

## Biodiversità in agricoltura

### Rubriche

- 06. Notizie
- 10. Produzioni e mercati
- 12. Dai laboratori
- 16. Normativa sulle sementi

### Ricerca

- 18. Varietà da conservazione in Lombardia:  
la Cipolla Rossa di Breme

G. Rossi, P. Bergamo, E. R. Tazzari, E. Vegini, C. Delogu, L. Andreani, M. Schiavi

- 26. Erba medica: confronto tra varietà di recente costituzione nella pianura irrigua del nord Italia

L. Borrelli, L. Degano, S. R. Motta, A. Passerini, P. Broglia, C. Tomasoni

### Tecnologia

- 34. Linee guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale di interesse per l'agricoltura

M. Marino, R. Bravi, O. Porfiri

- 43. L'attività sementiera in Sardegna

M. Dettori, L. Tamborini

- 49. L'approccio del Sud est Asiatico alla governance delle biotecnologie agricole

G. Adduci

### Trasformazione

- 53. I mais della Garfagnana: valorizzazione del prodotto e del territorio

M. Macchia, L. Ceccarini, F. Fiorani

### Statistiche

- 60. Andamento della produzione di seme 2008 - 2012

**Direttore Responsabile**  
Alessandra Santoro  
alessandra@scaicomunicazione.com

**Direttore Editoriale**  
Elena Astrua Testori  
direttore@dalseme.it

**Comitato Editoriale**  
Mario Colombo  
Salvatore Petrolì  
Giuseppe Merisio  
Mario Falcinelli

**Comitato di Redazione**  
Pier Giacomo Bianchi  
Maria Losi  
Cristina Giannetti

**Proprietario**  
INRAN  
Istituto Nazionale di Ricerca per gli  
Alimenti e la Nutrizione  
Via Ardeatina 546 - 00187 Roma  
Tel. +39 06 51494.1  
Fax +39 06 5146455

**Editore**  
SCAI Comunicazione  
Via Pantoni di Freda, 6  
85100 - Potenza  
Tel. 0971 46611 | Fax 0971 45116  
info@scaicomunicazione.com

**Stampa**  
Tipografia Stes  
85100 - Potenza (Pz)

**Per la pubblicità contattare:**  
SCAI Comunicazione  
advertising@dalseme.it

**Per gli abbonamenti**  
35 € spese di sped. incluse  
CCP n.91327908  
Causale: Abbonamento  
annuale rivista Dal Seme

**Foto Copertina**  
Luigi Tamborini

## Varietà da conservazione in Lombardia: la Cipolla Rossa di Breme

*Viene qui definita la possibile procedura di caratterizzazione e conservazione ex situ (Seed Bank) e on farm, proposta dagli autori come modello operativo valido anche per altre varietà in vista dell'istituzione in Lombardia del Registro Regionale delle Varietà da Conservazione*

Graziano Rossi<sup>1</sup>, Paolo Bergamo<sup>2</sup>, Elena R. Tazzari<sup>1</sup>, Emanuele Vegini<sup>1</sup>, Chiara Delogu<sup>3</sup>, Lorella Andreani<sup>3</sup>, Massimo Schiavi<sup>4</sup>

### *Landraces in Lombardy: Red Onion of Breme*

*The present study deals with the issue of biodiversity in agriculture, in the light of the directives and norms aimed at its preservation, in particular the so-called landraces. To the purpose, it was chosen for Lombardy the "Red Onion of Breme" (Pavia), an old local variety from the area Lomellina. It is therefore defined here the possible practice for characterization and ex situ (Seed Bank) and on farm conservation, proposed by the authors as a potentially operating model for other varieties, with a view to the institution of the Lombardy Regional Register of Landraces.*

**Keywords:** Red Onion of Breme, Register, Landraces, Seed Bank, agri-alimentary sector, ex situ, on farm.

Il concetto di agro-biodiversità si può descrivere come "la ricchezza di varietà, razze, forme di vita e genotipi, nonché la presenza di diverse tipologie di habitat, di elementi strutturali (siepi, stagni, rocce, ecc.), di colture agrarie e modalità di gestione del paesaggio" (Büchs, 2003).

L'Italia è il paese europeo più ricco di biodiversità, sia agricola sia naturale, grazie alla sua articolata conformazione geomorfologica, alla diversità climatica e alla sua eterogeneità agro-ambientale: è una biodiversità storica, legata alla modificazione dei paesaggi e alla cultura propria di ogni regione.

Preservare la biodiversità agricola significa, quindi, salvare un patrimonio genetico, ma anche economico, sociale e culturale di straordinario valore, fatto di eredità contadine e artigiane ricche e complesse. Le varietà di specie coltivate, che rispondono a requisiti di unicità e rarità, denominate all'interno dell'Unione Europea "Varietà da Conservazione" (VC, art. 3 D.Lgs. 149/2009 e art. 1 D.Lgs. 267/2010) e, più in generale, *Landraces* (Harlan, 1975; Zeven, 1998), rappresentano quindi la memoria storica (cultura rurale, saperi popolari e pratiche locali) e biologica dell'agricoltura, per quanto attiene l'allevamento vegetale (ecotipi legati a particolari climi o microclimi o situazioni edafiche speciali).

Le VC presentano spesso eccellenti qualità organolettiche e nutrizionali, sempre più apprezzate dai consumatori, a caccia di antichi sapori da riscoprire.

Inoltre le antiche varietà sono probabilmente portatrici di fattori di resistenza, che hanno permesso

loro di sopravvivere alle avversità dovute ai cambiamenti climatici, nonché a molti parassiti e per questo di nuovo potenzialmente interessanti per continuare a produrre alimenti in condizioni che richiedano meno apporti idrici ma anche meno pesticidi.

Inoltre, la biodiversità degli agro-ecosistemi è stata riconosciuta a livello globale come una risorsa, la cui conservazione è indispensabile alla sopravvivenza dell'umanità e alla sostenibilità delle attività economiche, a partire dal settore agro-alimentare.

Nonostante ciò in Italia il patrimonio varietale di interesse agrario è pericolosamente in decremento, a causa principalmente dell'agricoltura intensiva (ISPRA, 2010b).

Risulta quindi necessario avviare rapidamente un progetto nazionale, che miri a censire capillarmente tutta la diversità ancora disponibile ed a salvarla, prima che sia irrimediabilmente persa.

Si è quindi ritenuto interessante ipotizzare per le VC un modello gestionale per la Regione Lombardia, finalizzato all'attuazione della normativa in materia e in grado di mettere a frutto le diverse competenze già presenti localmente.

Allo scopo l'Università di Pavia ha attuato, a partire dal 2009, un'attività pilota per la conservazione *ex situ* di sementi di VC lombarde, al fine di mettere a sistema il processo tecnico-scientifico di definizione della qualità di VC e delineare un protocollo standard eventualmente adottabile in futuro a livello regionale.

Come modello sperimentale principale è stata scelta una potenziale VC che rispondesse bene ai

<sup>1</sup>Università di Pavia - Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente - Lombardy Seed Bank/CFA, - [graziano.rossi@unipv.it](mailto:graziano.rossi@unipv.it) - [www.floraconservation.com](http://www.floraconservation.com)

<sup>2</sup>ERSAF - Servizio Fitosanitario, Milano

<sup>3</sup>INRAN-ENSE - Laboratorio di Tavazzano

<sup>4</sup>CRA- Unità di Ricerca per l'Orticoltura (Montanaso Lombardo, Lodi)

La bibliografia è pubblicata sul sito [www.dalseme.it](http://www.dalseme.it)



## QUADRO NORMATIVO

A livello mondiale, il quadro legislativo sul tema della biodiversità e della conservazione del patrimonio ambientale è assai articolato: i vari protocolli internazionali definiscono orientamenti e obiettivi a lungo termine, ma, di fatto, non vincolano in maniera determinante le singole azioni nazionali.

In Europa, le politiche agricole adottate dalla UE riguardano soprattutto le regole di mercato e gli aspetti legati alla produzione ed alla trasformazione, mentre il rapporto fra agricoltura e conservazione dell'ambiente naturale è stato inizialmente trascurato.

Nell'ultimo decennio, però, la Politica Agricola Comunitaria (PAC) ha preso in maggiore considerazione lo sviluppo sostenibile e la tutela ambientale del territorio agro-silvo-pastorale.

Nel prossimo Piano di Sviluppo Rurale (PSR) 2014-2020 ci si aspetta inoltre un'ulteriore attenzione alle questioni ambientali e quindi ai servizi ecosistemici forniti dall'agricoltura.

La Commissione delle Comunità Europee, nel marzo del 2001, ha predisposto il "Piano di Azione a Favore della Biodiversità in Agricoltura"; successivamente il Consiglio europeo di Goteborg, nel giugno 2001, ha approvato la Strategia dell'Unione Europea per lo sviluppo sostenibile, che è stata ribadita anche dalle conclusioni del Consiglio agricolo UE per l'integrazione della tutela ambientale e dello sviluppo sostenibile nella politica agricola comune.

Più recente è la "European Strategy for Plant Conservation 2008-2014" (ESPC), che fissa per l'anno 2014 la preparazione di un inventario europeo delle varietà locali tradizionali (Planta Europa, 2008).

I moderni Piani di Sviluppo Rurale, inoltre, tendono sempre più a privilegiare gli aspetti relativi alla conservazione delle forme tradizionali di agricoltura e alla tutela dei prodotti tipici locali, consentendo in questo modo il recupero delle antiche varietà vegetali

e razze animali.

In Italia, il MiPAAF, mediante il "Piano nazionale sulla biodiversità di interesse agricolo" (PNBA), approvato durante la Conferenza Stato-Regioni del 2008, ha identificato gli strumenti necessari alla tutela della biodiversità in agricoltura, nel rispetto della normativa esistente e dei principi contenuti nei documenti programmatici nazionali e internazionali, ed in particolare ha previsto l'istituzione del Registro Nazionale e dei Registri Regionali delle Varietà da Conservazione (RRVC), al fine di catalogare, caratterizzare e conservare *in situ* (aziende agricole "custodi") ed *ex situ* (banche dei semi per lo stoccaggio a lungo termine del germoplasma) le VC. Premessa riconosciuta di tutte le azioni di conservazione è la caratterizzazione e l'iscrizione delle VC in tali Registri.

I Decreti Legislativi 149/2009 per le specie agricole e 267/2010 per le specie orticole, nonché il Decreto Ministeriale 17/12/2010 "Disposizioni applicative del DLgs. 29/10/2009 n. 149", definiscono i criteri di ammissibilità al Registro Nazionale e i contenuti della domanda di iscrizione, precisando che l'esame di detta domanda, con espressione di parere vincolante, sia effettuata dalle Regioni competenti per territorio.

Perciò, risulta importante per le Amministrazioni Regionali dotarsi del registro delle VC, che costituisce la base informativa indispensabile per pianificare ed attuare la tutela e la valorizzazione delle risorse genetiche, così come richiesto dalla ESPC (Lorenzetti *et al.*, 2009).

Alcune Regioni, tra le quali Toscana, Emilia-Romagna, Campania, Lazio, Marche, Piemonte, Veneto, Umbria si sono già dotate di apposite norme per la tutela e la valorizzazione della biodiversità rurale, come appare nella tabella sotto riportata:

Regione	Riferimento normativo	Nome e/o articolo d'interesse
Basilicata	L.R.n. 26 del 14/10/2008	"Tutela delle risorse genetiche autoctone vegetali ed animali".
Campania	L.R.n. 1 del 19/1/2007	"Legge finanziaria regionale 2007" Art. 33 Norme in materia fitosanitaria "(...) si istituisce la banca regionale del Germoplasma, (...) nel contempo si istituisce la rete di conservazione e sicurezza delle risorse genetiche a rischio di estinzione".
Emilia-Romagna	L.R.n. 1 del 29/01/2008	"Tutela del patrimonio di razze e varietà locali di interesse agrario del territorio emiliano-romagnolo".
Friuli-Venezia Giulia	L.R.n. 11 del 22/04/2002	"Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario e forestale".
Lazio	L.A.n. 15 del 1/03/2000	"Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario".
Marche	L.R.n. 12 del 3/06/2003	"Tutela delle risorse genetiche animali e vegetali del territorio marchigiano".
Toscana	L.R.del 16/11/2004, n.64	"Tutela delle risorse genetiche autoctone": "Tutela e valorizzazione del patrimonio di razze e varietà locali di interesse agrario, zootecnico e forestale".
Umbria	L.R.n. 25 del 4/09/2001	"Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario".
Veneto	L.R.n. 40 del 12/12/2003	"Nuove norme per gli interventi in agricoltura". Art. 69 Tutela delle risorse genetiche autoctone di interesse agrario.
Piemonte	Delib. Giunta Reg.le del 20/11/2011 n. 105-3012	Procedura per la presentazione e l'istruttoria delle domande di iscrizione alla sezione varietà da conservazione del Registro Nazionale delle Varietà di Specie Agrarie e Ortive

Tabella 1: Principali riferimenti normativi inerenti la conservazione delle risorse genetiche in agricoltura

requisiti di legge: la Cipolla Rossa di Breme (CRB). Essa si fregia del marchio De.C.O. (Denominazione Comunale di Origine) e alimenta un'interessante



Fig. 1: Cipolla Rossa di Breme (CRB).

filiera di nicchia, anche grazie ad una rinomata sagra gastronomica che dal 1982 si tiene a Breme (PV) nel mese di giugno (Bondesan, 2011; Rossi *et al.*, 2011).

Sebbene non esista una documentazione specifica sull'inizio della coltivazione di questa cultivar, la tradizione popolare vuole sia antichissima, facendola risalire ad alcuni monaci che si insediarono a Breme nel X secolo.

Il lavoro qui presentato ha comportato la collaborazione di vari enti, che nel loro insieme costituiscono il modello di procedura che si intende proporre: la banca dei semi (*Lombardy Seed Bank*), l'ente locale competente per territorio di coltivazione (il Comune di Breme), l'ente esperto per la caratterizzazione agronomica (il CRA-Unità di Ricerca per l'Orticoltura di Montanaso Lombardo), l'ente esperto per la caratterizzazione genetico-molecolare (INRAN-ENSE Laboratorio Analisi Sementi di Tavazzano) e l'ente regionale per lo sviluppo agricolo (ERSAF).

## Materiali e metodi

### **Documentazione generale, reperimento dei semi e conservazione in situ**

L'ente capo-progetto, l'università di Pavia, in collaborazione con ERSAF, ha contattato le autorità locali competenti per territorio, per acquisire informazioni generali sulla varietà.

Per la CRB il lavoro è stato agevole, in quanto è già presente una De.C.O., approvata con delibera comunale, che vale ad attestare l'origine locale del prodotto, la tipicità e le modalità di produzione, secondo apposito disciplinare.

Esiste anche un elenco delle imprese agricole autorizzate ad utilizzare tale marchio sui propri prodotti, da cui sono stati selezionati i potenziali agricoltori custodi, che hanno fornito i semi per la conservazione *ex situ*.

L'indagine bibliografica ha evidenziato come la CRB fosse già stata oggetto di studio (Schiavi *et al.*, 2004, ERSAF, 2008, Bondesan, 2011).

Tali studi sono stati utilizzati per produrre la bozza della scheda varietale, implementata poi dagli studi di caratterizzazione agronomica e genetica qui svolti.

### **Caratterizzazione agronomica e selezione conservatrice (CRA Orticoltura di Montanaso Lombardo)**

La CRB rappresenta uno dei pochi esempi di cipolla a giorno corto autoctoni dell'Italia settentrionale. Il bulbo di forma piatta e di colore vinaceo raggiunge dimensioni ragguardevoli (400-800 g) ed è caratterizzato da bassa pungenza, caratteristica che lo rende idoneo anche al consumo a crudo.

La pianta è molto vigorosa, caratterizzata da foglie ricche di cera e sensibile alle principali malattie dell'apparato fogliare. La tecnica colturale prevede la semina in semenzaio dalla seconda metà di agosto alla prima decade di settembre e il trapianto a dimora in tutto il mese di ottobre. I sestri di impianto adottati sono di 30-40 cm tra le file e 6-10 cm sulla fila; la raccolta si concentra generalmente nella prima quindicina di giugno dell'anno successivo alla semina.

La selezione conservatrice è stata realizzata partendo da un campione di seme reperito a Breme (PV) nel 2001. La semina è stata effettuata nel mese di settembre in contenitori alveolati ed il trapianto in pieno campo è avvenuto nel mese di ottobre.

Durante il ciclo vegetativo sono stati rilevati lo stato fitosanitario ed il vigore della pianta e si è provveduto ad eliminare le piante ammalate, deboli o con colore e "cerosità" non corrispondente alla media della popolazione. Alla raccolta, effettuata quando le foglie risultavano allettate, i bulbi sono stati posti ad essiccare in serra e successivamente è stata effettuata la selezione scegliendo i bulbi con dimensione, forma, vestitura e colore tipici della popolazione.

I bulbi scelti sono stati posti in conservazione in magazzino e nell'autunno trapiantati in isolamento spaziale per ricostituire la popolazione. Complessivamente sono stati sinora effettuati quattro cicli di selezione conservativa.

Nel 2008 la popolazione selezionata di cipolla Rossa di Breme è stata inserita in un confronto varietale con altre varietà a giorno corto e valutata per produzione e caratteristiche morfologiche del bulbo. Per il confronto sono state utilizzate due varietà a bulbo bianco (Bianca di Maggio e Bianca di Giugno), una a bulbo giallo (Paglierina di Sermide) e due a bulbo rosso (Rossa di Breme e Rossa di Tropea).

Il disegno sperimentale adottato è stato a blocchi randomizzati con tre repliche; la parcella elementare di 6 m<sup>2</sup> con un sesto d'impianto di 40 cm tra le file e 15 cm sulla fila. Oltre alla produzione (t/ha) sono stati rilevati il peso medio del bulbo, la lunghezza del ciclo vegetativo e la percentuale di bulbi doppi.

Inoltre mediante punteggio da 1 (scarso) a 5 (elevato) sono stati valutati: vigore e stato fitosanitario della pianta, grado di vestitura, uniformità di forma, pezzatura e colore del bulbo.

#### **Caratterizzazione genetico-molecolare (INRAN-ENSE laboratorio di Tavazzano)**

Allo scopo di evidenziarne l'unicità, è stato realizzato uno studio per la caratterizzazione genetica della CRB con marcatori molecolari. Il materiale analizzato, fornito dal CRA-ORL Montanaso Lombardo, era costituito da una selezione a bulbo rosso con le caratteristiche morfologiche tipiche della varietà (Bo4), da una popolazione originaria (BO) comprendente individui con colore del bulbo variabile (rosso/giallo) e da una selezione a bulbo giallo (BG). Nello studio sono stati inoltre inclusi l'ibrido commerciale *Red Mech* (RM) e altre varietà locali come la Tropea lunga (TL), la Tropea tonda (TT), la Cipolla tonda di

#### **IL PROGETTO DI CONSERVAZIONE DELLE VC PRESSO LA LOMBARDY SEED BANK**

L'Università di Pavia, Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, ha attuato, a partire dal 2009, un progetto pilota per lo stoccaggio a lungo termine (conservazione *ex situ*) in modo sicuro e documentato di sementi di VC lombarde (in analogia con quanto viene già fatto dal 2004 per le specie autoctone della flora spontanea), presso la banca del germoplasma regionale (*Lombardy Seed Bank* (LSB)/Centro Flora Autoctona), che ha sede operativa presso l'Orto Botanico dell'Università di Pavia (Rossi & Mondoni, 2010).

Il progetto si propone di dare un contributo concreto alla salvaguardia delle VC e vuole al contempo sollecitare l'istituzione del Registro Regionale delle Varietà da Conservazione (RRVC), ancora assente in Regione Lombardia. Auspicata conseguenza di queste attività è la valorizzazione della filiera commerciale dei prodotti agroalimentari tipici, a cominciare da una solida base costituita dalla produzione riconosciuta e controllata del seme.

Tra le specie trattate negli ultimi tre anni, si ricordano: il Mais Rostrato Rosso di Rovetta e il Mais Spinato di Gandino in provincia di Bergamo (grazie all'interessamento del Parco Regionale delle Orobie Bergamasche ed il CRA di Stezzano - BG), per la provincia di Pavia il Fagiolo Borlotto di Gambolò, la Zucca Bertagnina di Dorno, il Peperone di Voghera, la Cipolla Dorata di Voghera e la Cipolla Rossa di Breme, mentre si è avviata la conservazione di diverse varietà di riso, grazie all'Ente Nazionale Risi.

Alife (AL) con caratteristiche morfologiche assimilabili alla Cipolla di Breme.

Il DNA è stato estratto a partire da circa 200 mg di giovani foglie ottenute da piantine di 15 giorni. Per l'estrazione è stato utilizzato il protocollo C-TAB riportato da Doyle & Doyle (1990).

Per poter ottenere un profilo molecolare degli individui oggetto di studio è stata effettuata inizialmente un'analisi AFLP (*Amplification fragment length polymorphism*) (Vos *et al.*, 1995), che prevede l'amplificazione selettiva di tratti di DNA, precedentemente digerito con specifici enzimi di restrizione. I frammenti così ottenuti sono rappresentativi dell'intero genoma. Nella fase di amplificazione selettiva sono state testate 4 combinazioni di primer.

Ciascuna combinazione di primer ha generato un profilo molecolare molto ricco di frammenti di DNA ma con un livello di polimorfismo molto basso, tale da non poter distinguere i diversi genotipi oggetto di studio (dati non mostrati).

Risultati simili sono stati rilevati in bibliografia

dove è stato riscontrato un basso livello di polimorfismo intraspecifico (Van Heusden *et al.*, 2000).

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi AFLPs e dai dati riscontrati in bibliografia lo studio è proseguito utilizzando marcatori di tipo SSR (*Single Sequence Repeats*).

Questo tipo di marcatori è ben distribuito nel genoma, presenta un livello di polimorfismo elevato, è facilmente rilevabile, altamente ripetibile, locus-specifico e codominante.

Tabella 2: Elenco delle varietà di cipolla messe a confronto per la caratterizzazione genetica e numero di individui esaminati.

POPOLAZIONE/VARIETÀ ANALIZZATA	NUMERO DI INDIVIDUI
BREME a bulbo rosso selezione 04 (Bo4)	19
BREME popolazione originaria (BO)	10
BREME a bulbo giallo (BG)	5
Tonda di Alife (AL)	5
Tropea tonda (TT)	5
Tropea lunga (TL),	5
Red Mech (RM)	5

Queste peculiarità li rendono interessanti per gli studi di caratterizzazione genetica di specie e/o varietà. In questo studio sono stati presi in considerazione sette loci microsatellite variamente distribuiti nel genoma ed elencati di seguito: ACM004, ACM006, ACM24, ACM91, ACM93, ACM101, ACM132 (Vijay *et al.*, 2009; Khar *et al.*, 2011).

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume finale di 25 µl contenente 20 ng di DNA genomico, 2,5 µl 10x PCR buffer, dNTPs 200 µM,

MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, primer Forward e Reverse 0,5 µM, 1U Taq DNA polymerase (Invitrogen).

Il protocollo termico prevedeva la denaturazione iniziale a 94°C per 3 minuti, 35 cicli a 94°C per 45 secondi, 55°C 30 secondi 72°C per 1 minuto e 30 secondi, seguiti da 10 minuti di elongazione finale a 72°C.

I prodotti di PCR sono stati separati su un gel di acrilamide al 5% in condizioni denaturanti, la rilevazione è stata effettuata mediante colorazione con Argento nitrato.

### Conservazione ex situ (LSB - Lombardy Seed Bank)

Attualmente un campione di circa 317.500 semi di CRB, forniti dal Sig. Francesco Bagna e dal Sig. Giovanni Zanni (i "custodi") di Breme (PV) nonché dal CRA Orticoltura di Montanaso Lombardo (LO), è conservato a lungo termine presso la LSB, nel rispetto degli standard tecnico-scientifici più moderni (ENSCONET, 2009).

I semi sono stati sottoposti per 30 giorni a disidratazione per portali ad avere un contenuto in acqua pari circa al 3-4%, attraverso la permanenza in un'apposita camera della banca semi (*drying room*), in cui viene mantenuto, a ciclo continuo, un flusso d'aria secca e fresca (15°C e 15% UR); scaduto tale periodo sono stati verificati i valori di temperatura e umidità dei semi attraverso l'uso di una sonda denominata Rotronic.

Appurata la disidratazione effettiva del campione, i semi sono stati riposti in vasi di vetro temperato a tenuta stagna e congelati alla temperatura di -18°C, se-

Tabella 3: Campioni di Cipolla Rossa di Breme conservati presso la LSB (Università di Pavia) e relative caratteristiche.

Codice	Specie	Dati di caratterizzazione						Dati sul congelamento			
		Data accessione	Fornitore semi	Luogo di coltura	Massa campione (g)	Massa 1000 semi (g)	N° tot semi	Data congelamento	T (°C)	UR%	Codice freezer
A4PV	Allium cepa	26/02/2010	Bagna	Breme	26,631	2,976	9.140	19/03/2010	15,2	15,2	L1-3
A5PV	Allium cepa	26/02/2010	Zanni	Breme	27,749	2,816	7.457	19/03/2010	14,9	15,7	L1-3
A7LO	Allium cepa	31/03/2010	Schiavi	CRA	100,530	3,970	24.072	20/05/2010	16,5	15,8	L1-2
A13PV	Allium cepa	26/09/2011	Bagna	Breme	4,466	3,169	1.345				
A14PV	Allium cepa	27/09/2011	Varesini	Breme	16,190	3,473	4.475				
A15PV	Allium cepa	28/09/2011	Zanni	Breme	12,486	3,398	3.885				
A16PV	Allium cepa	29/09/2011	Re	Breme	18,524	3,246	5.422				
A17PV	Allium cepa	30/09/2011	Migliorati	Breme	13,742	3,298	3.833				
A18PV	Allium cepa	01/10/2011	Molo	Breme	15,377	3,402	4.297				
A19PV	Allium cepa	02/10/2011	Rigone	Breme	16,136	3,438	4.492				

condo i protocolli standard di *seed banking* (IBPGR, 1985; I.S.T.A., 1985, ENSCONET, 2009).

Sui semi, sia freschi (prima del congelamento) che congelati, sono stati anche eseguiti test fitosanitari e di germinabilità. Il test eseguito sui semi appena giunti alla banca del germoplasma (quindi non congelati, né disidratati) è stato condotto per poter individuare le condizioni ottimali di germinazione (temperatura, fotoperiodo, eventuali pretrattamenti di stratificazione fredda o calda – mantenimento dei semi in condizioni di basse o alte temperature per periodi variabili da 4 a 8 settimane – per la rimozione di eventuali fenomeni di dormienza dei semi).

Una volta appurate tali caratteristiche, sono stati eseguiti i test sui campioni congelati, utilizzando la medesima temperatura adottata nel test precedente.

## Risultati

### Caratterizzazione agronomica e selezione conservatrice (CRA Orticoltura di Montanaso Lombardo)

La selezione conservatrice ha consentito di uniformare le caratteristiche morfologiche del bulbo. Rispetto alla popolazione di origine sono stati migliorati uniformità di pezzatura, colore e vestitura del bulbo. Tuttavia sono necessari ulteriori cicli di selezione per migliorare uniformità di forma, stato fitosanitario e percentuale di bulbi doppi.

I risultati della prova di confronto varietale sono riportati in tabella 4.

La CRB ha mostrato una buona precocità, risultando seconda solo alla Rossa di Tropea.

Medio è apparso il vigore e lo stato fitosanitario della pianta.

Insufficiente è apparsa l'uniformità di forma, mentre discreti risultano colore, vestitura e pezzatura. Ancora elevato il numero di bulbi doppi.

La produzione commerciale (t/ha) è riportata in figura 1. La cipolla Rossa di Breme ha fornito circa 50 t/ha, piazzandosi al secondo posto dopo la Paglierina di Sermide.

### Caratterizzazione genetico-molecolare (INRAN laboratorio di Tavazzano)

Dei sette SSR analizzati, cinque hanno dato profili leggibili e un buon livello di polimorfismo, mentre due (ACM006, ACM24) hanno dato origine a profili

Varietà	Ciclo gg	Vigore P:1-5	Stato Fitosanit. P:1-5	Uniform. Forma P:1-5	Uniform. pezzatura P:1-5	Uniform. colore P:1-5	Vestitura P:1-5	Bulbi Doppi %	Peso medio g
Rossa di Breme CRB	174	3,5	2,5	2,8	3	3,5	3,5	5	268
Paglierina di Sermide	206	4,5	2,2	3,7	3,5	4	3,8	1	175
Bianca di Maggio	162	5	3	3,8	3,8	5	4,8	0	270
Bianca di Giugno	177	4	3	3,3	3,5	3,8	3,3	7	195
Rossa di Tropea	164	4,8	3	4	3,8	4,8	3,8	0	197

Tabella 4: Caratteristiche della pianta e del bulbo della cipolla Rossa di Breme a confronto con 4 varietà a giorno corto.

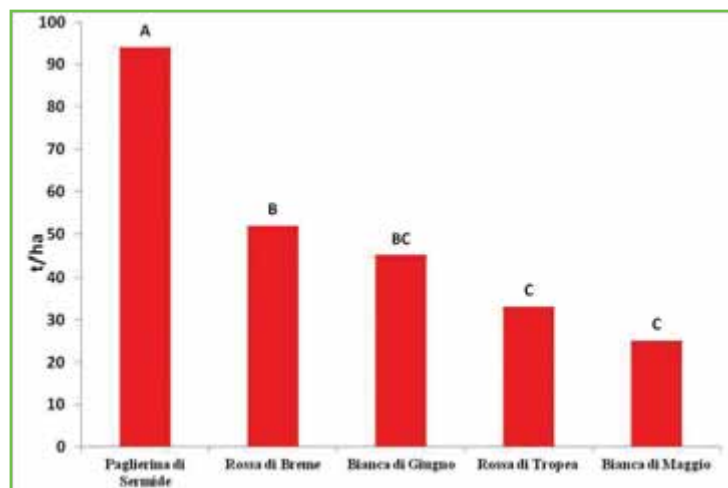


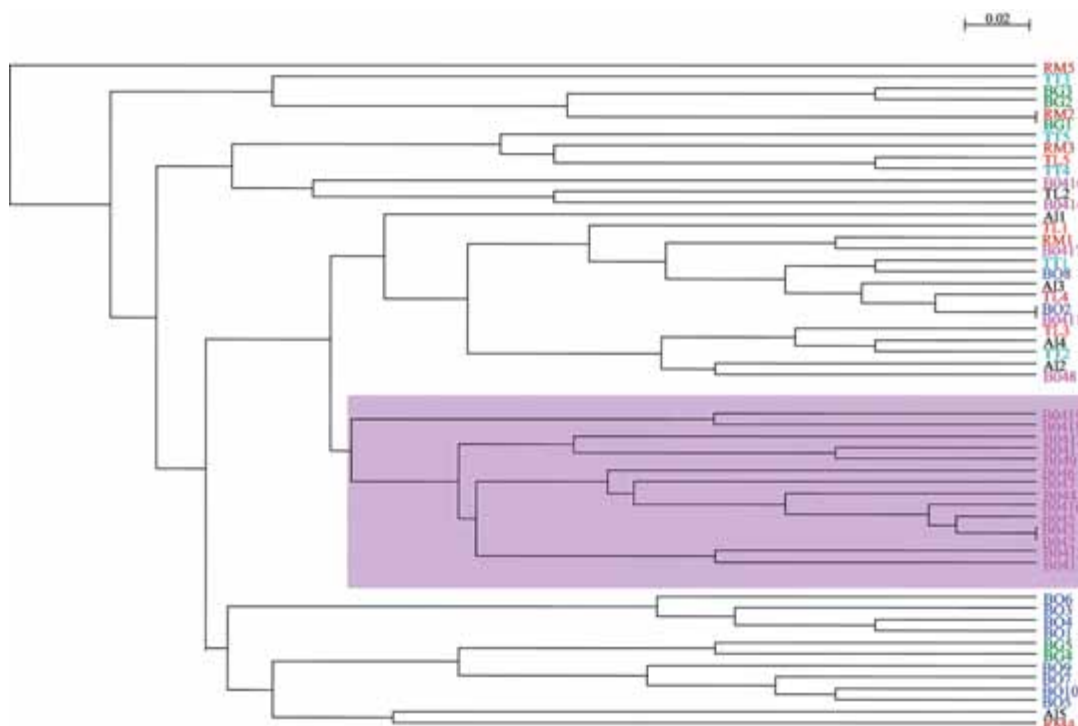
Fig. 2: Produzione commerciale della Rossa di Breme a confronto con 4 varietà italiane di cipolla a giorno corto

difficilmente interpretabili o scarsamente polimorfici e non sono stati inclusi nella successiva elaborazione. Nei 54 individui analizzati sono stati rilevati 20 frammenti polimorfici variamente distribuiti tra i differenti loci considerati, con un numero medio di alleli per locus pari a 4 e con un *Polimorfic Index Content* medio variabile da un minimo di 0,33 ad un massimo di 0,50.

Questo indice fornisce una stima della capacità di discriminazione di un locus SSR, considerando non solo il numero di alleli presenti al locus, ma anche la loro frequenza: più alto è il suo valore migliore è



Fig. 3: Dendrogramma ottenuto con algoritmo UPGMA (Brema selezione '04 - Bo4, Brema Originale - BO, Brema Gialla - BG, Red Mech - RM, Tropea Lunga - TL, Tropea Tonda - TT, Cipolla di Alife - AL).



tale capacità.

Le relazioni filogenetiche tra le diverse accessioni sono state stimate dal profilo molecolare di ciascun individuo grazie alla rielaborazione delle distanze genetiche con l'algoritmo UPGMA.

Il dendrogramma ottenuto (fig. 3) mostra grande variabilità genetica tra tutti gli individui osservati, ciò nonostante la popolazione della cipolla di Brema sia ben differenziabile dalle altre varietà. Inoltre a conferma dell'azione della selezione conservatrice, la maggior parte degli individui della popolazione Brema '04, ben 14 dei 20 considerati, sono raggruppati in un unico ramo (Fig 3 - riquadro viola).

Nonostante il carattere preliminare dello studio genetico, i risultati confermano la distinguibilità della CRB.

Potrebbe essere opportuno estendere l'analisi ad un numero maggiore di marcatori e di individui per

valutare in modo più approfondito le relazioni filogenetiche tra le varietà studiate e indirizzare al meglio la selezione conservatrice della CRB.

#### **Conservazione ex situ (LSB - Lombardy Seed Bank)**

Il test di germinabilità condotto sul campione di semi freschi (A5PV) provenienti dalla C.na Favorita di Brema, ha dato come risultato il 100%. Anche i test successivamente eseguiti sui semi congelati hanno prodotto risultati molto vicini al 100%, tranne che per il campione di semi (A7LO) fornito dal CRA Orticoltura di Montanaso Lombardo (germinabilità 30%), in quanto i semi, mantenuti a circa +4°C, avevano presumibilmente già subito un invecchiamento di alcuni anni, che ha notevolmente abbassato la loro vitalità.

Nella tabella 5 sono indicati i dati relativi ai test di germinazione effettuati.

Codice	Specie	Start g-test	Condizioni	N° tot semi testati	N° germ.	N° morti	N° vuoti	N° vivi	% germ.	% morti	% vuoti	% vivi
Test di germinazione pre-congelamento												
A5PV	Allium cepa	3/15/2010	20°C	30	30	0	0	0	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%
Test di germinazione post-congelamento												
A4PV	Allium cepa	4/21/2010	20°C	30	26	2	1	1	86,7%	6,7%	3,3%	3,3%
A5PV	Allium cepa	4/21/2010	20°C	30	29	1	0	0	96,7%	3,3%	0,0%	0,0%
A7LO	Allium cepa	6/8/2010	20°C	30	9	13	1	7	30,0%	43,3%	3,3%	23,3%

Tabella 5: Test di germinazione effettuati sui campioni di Cipolla Rossa di Breme conservati presso la LSB.

## Discussione e conclusioni

Dallo studio emerge che la CRB possiede caratteristiche estremamente peculiari, che conferiscono unicità a questa potenziale VC nel panorama regionale e nazionale.

Il progetto ha inoltre consentito di mettere a punto una documentazione sulla CRB che potrà essere utilizzata per la presentazione della domanda di iscrizione al Registro Nazionale.

L'utilizzo di marcatori molecolari si conferma essere un valido supporto per studi mirati alla caratterizzazione genetica di specie e varietà.

L'inclusione del profilo molecolare tra i caratteri descrittivi è quindi uno strumento efficace per la conservazione delle varietà locali e la tutela della loro unicità.

Vista l'ampia gamma delle tecniche disponibili e la loro rapida evoluzione, un organismo internazionale come l'UPOV (*International Union for the Protection of new Varieties of Plants*), ha definito delle linee guida generali per la selezione di marcatori molecolari da utilizzare per la caratterizzazione varietale e la costruzione di database (UPOV/INF/17/1) pubblici per le diverse specie.

Facendo riferimento a questi principi generali sarà possibile selezionare i marcatori che meglio si adattano alle caratteristiche genetiche tipiche di ogni specie.

Questo consentirà di sviluppare protocolli con marcatori in grado di distinguere la varietà di interesse ed includere tali profili nelle schede descrittive per

l'iscrizione ai Registri regionali o nazionali.

Si è altresì dimostrato che la conservazione delle varietà di interesse locale può essere realizzata, almeno in Lombardia, sfruttando competenze e infrastrutture già presenti in regione.

Allo scopo è però necessario procedere all'istituzione del Registro Regionale delle Varietà da Conservazione, registro che possa catalizzare e omologare tutte le iniziative che dovranno essere prese in materia, per soddisfare una normativa che è ormai divenuta molto puntuale in un settore la cui valorizzazione rappresenta una valida misura contro gli aspetti meno positivi della globalizzazione in agricoltura.

In connessione al Registro delle Varietà, risulta auspicabile l'istituzione del registro degli agricoltori custodi e l'individuazione formale della banca dei semi.

Il progetto evidenzia cioè l'importanza di creare una sinergia tra conservazione *ex situ* e *on farm*.

La banca dei semi costituisce in particolare l'istituzione che concretamente fa da riferimento ai coltivatori custodi per la conservazione sicura e controllata dei loro semi, costituendone una riserva necessaria proprio in considerazione della loro rarità e unicità.

Infine, tale progetto ha consentito di sviluppare le basi nozionistiche per ampliare la presente procedura sperimentale alle altre VC sia, in primo luogo, lombarde, che successivamente, eventualmente, di tutta Italia.

In tal senso saranno di grande utilità le Linee Guida per la conservazione e la caratterizzazione della biodiversità vegetale, animale e microbica di interesse per l'agricoltura, emanate dal MiPAAF nel 2012.