

ADRIANO MAROCCO*, VIRGINIA MARIA GRAZIA BORRELLI*,
ALESSANDRA LANUBILE*

Uso dell'approccio CRISPR/Cas per lo studio della resistenza dei cereali ai patogeni

INTRODUZIONE

Le mutazioni sono alla base dell'evoluzione, della biodiversità e del miglioramento genetico. Queste possono derivare naturalmente dalla riparazione di errori dovuti al processo di replicazione o da danni a carico del DNA. A partire dagli anni Trenta del XX secolo, il "mutation breeding" ha impiegato l'esposizione a radiazioni e il trattamento con agenti chimici per aumentare la frequenza di mutazioni utili. Quarant'anni più tardi, sono stati identificati gli enzimi di restrizione e i meccanismi molecolari di difesa batterica sono stati elucidati. Ad oggi tra le più importanti classi di enzimi di restrizione ci sono le nucleasi sito-specifiche, come quelle basate 1) sulla struttura "a dita di zinco" (Zinc-Finger Nucleases, ZFN), 2) sulla struttura TALE (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN) e 3) sul sistema CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas). A partire dal 1996 queste nucleasi sono state ingegnerizzate per modificare con altissima precisione il genoma degli organismi, dando l'avvio alla strategia del "genome editing". Più nel dettaglio, le ZFN e le TALEN sono nucleasi sintetiche con domini che si legano al DNA e sono in grado di tagliarlo in punti specifici. Entrambe richiedono la creazione di una proteina personalizzata per ogni sequenza di DNA da tagliare: questo requisito rende tali tecniche più dispendiose in termini di tempo e risorse economiche rispetto alla creazione degli "RNA a guida singola" utilizzati nel sistema CRISPR/Cas. Infatti, quest'ultimo risulta più facile da sviluppare, poiché viene

* *Dipartimento di Scienze delle Produzioni Vegetali Sostenibili (DIPROVES), Università Cattolica del S. Cuore, Piacenza*

richiesta la generazione di una molecola di RNA e non di una proteina, che va a riconoscere e legare il locus bersaglio sul DNA. Gran parte del lavoro iniziale della nuova piattaforma CRISPR è stato fondato da due ricercatrici (Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier), e nel giro di pochissimi anni si è diffuso a macchia d'olio. Il CRISPR ha un potenziale elevatissimo e proprio per questo ha generato una vera "CRISPR revolution", che spazia da applicazioni in ambito medico, farmacologico, biologico fino a quello agronomico. Le ricadute del CRISPR nel settore agricolo sono numerose e pongono questa piattaforma come la tecnologia più promettente per migliorare la sostenibilità ambientale, il mantenimento della biodiversità e la resistenza ai patogeni. Il "genome editing" permette di modificare o di introdurre un solo carattere favorevole e di mantenere inalterata la restante parte del genoma di una varietà.

La Cas9 è un'endonucleasi ingegnerizzata costituita da due componenti: l'enzima di taglio (Cas), che presenta due siti di taglio attivi (HNH and RuvC), uno per ciascun filamento della doppia elica di DNA, e una sequenza di RNA target che rappresenta il bersaglio del sistema di riconoscimento denominata "single-guide RNA". Manipolando la sequenza del single-guide RNA, il sistema artificiale Cas9 può essere ingegnerizzato in maniera tale da riconoscere e tagliare qualsiasi sequenza di DNA. La Cas taglia entrambi i filamenti di DNA in seguito al riconoscimento della sequenza target e la risultante rottura del doppio filamento viene riparata dal meccanismo delle estremità non omologhe (Non-homologous end joining - NHEJ) modificando la sequenza del gene bersaglio e causando corte inserzioni o delezioni di basi nucleotidiche. Oltre al meccanismo di NHEJ, il doppio filamento può essere riparato per omologia (Homologous Recombination - HR) ed è sfruttato per introdurre sequenze di DNA con alta omologia alle regioni di inserzione. Le modificazioni genetiche delle sequenze possono dare origine a mutanti omozigoti, eterozigoti o biallelici.

APPLICAZIONI

Il CRISPR si è diffuso anche in ambito vegetale con recenti applicazioni nel settore cerealicolo in cui sono state adottate diverse strategie di "editing" quali il "single", "double" e "multiplex targeting". Altrettanti metodi di "delivery" vengono riportati del complesso Cas come l'integrazione del complesso in maniera stabile all'interno nel genoma ospite, l'espressione transiente di DNA

SPECIE VEGETALE	PATOGENO	GENE BERSAGLIO	FUNZIONE GENICA	REFERENZA
<i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>SEC3A</i>	Subunità del complesso di esocitosi	Ma et al., 2018
<i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>ERF922</i>	Fattore di trascrizione in risposta a stress multipli	Wang et al., 2016
<i>Oryza sativa</i>	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>SWEET13</i>	Trasportatore del saccarosio	Zhou et al., 2015; Li et al., 2012
<i>Oryza sativa</i> L. <i>japonica</i>	<i>RSTV</i> (rice tungro spherical virus)	<i>eIF4G</i>	Effettore per il RSTV	Macovei et al., 2018
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>	<i>MLO-A1</i>	Gene di suscettibilità	Wang et al., 2014

Tab. 1 Applicazioni del CRISPR/Cas per la resistenza ai patogeni nei cereali

Table 1 CRISPR/Cas applications for pathogen resistance in crops

e RNA, e le ribonucleoproteine (RNPs). Il CRISPR è stato applicato in riso, mais, frumento, orzo e sorgo, dove sono state evidenziate variazioni significative di efficienza del sistema anche all'interno della stessa specie, mentre l'ottenimento di mutanti biallelici omozigoti può essere facilmente prodotto. Generalmente la frequenza delle delezioni mirate tra due "Double Strand Breaks" (DSBs) dipende dall'efficienza di scissione di ciascun "single-guide" RNA. L'adozione di strategie CRISPR in cui vengono utilizzati due "single-guide" RNA per l'ottenimento di "knockout" genico genera sia delezioni di alcune decine di basi che l'eliminazione di grandi segmenti cromosomici (115-250 kb). Il CRISPR può modificare siti con alta omologia di sequenza denominati "off-targets", di cui è possibile calcolare la probabilità di editing attraverso l'utilizzo di software specifici, come CRISPR-P e DESKGEN.

Le nuove biotecnologie possono conseguire risultati importanti, ad esempio con l'introduzione di resistenze agli stress. I risultati disponibili dell'applicazione del CRISPR nel settore della resistenza ai patogeni includono ad oggi solo 20 lavori, di cui 4 riguardanti riso e frumento e inerenti la resistenza al batterio *Xanthomonas oryzae*, al *Rice Tungro Spherical Virus* (RTSV) e ai funghi *Blumeria graminis* e *Magnaporthe oryzae* (tab. 1).

I bersagli genici dei patogeni sono ottimi candidati per lo sviluppo di varietà resistenti. La mutagenesi CRISPR/Cas9 del gene *O5SWEET13* è stata eseguita in riso per aumentare la resistenza alla batteriosi causata da *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Li et al., 2012; Zhou et al., 2015). Il batterio produce una proteina effettrice, PthXo2, che induce l'espressione di *O5SWEET13* nell'ospite e la conseguente condizione di suscettibilità. Il "knockout" del

gene impedisce l'uso di zuccheri prodotti dalle cellule della pianta da parte del patogeno. Anche la mutagenesi del promotore di *OsSWEET14* mediante un approccio TALEN ha reso l'effettore *X. oryzae* incapace di legarsi a *OsSWEET14*, generando una condizione di resistenza alla batteriosi. Il CRISPR-multiplex è un'ulteriore strategia di modificazione del genoma che potrà essere adottata per mutagenizzare più siti genici in una sola trasformazione: l'editing di siti bersaglio multipli dei principali effettori sarà il prossimo passo verso il raggiungimento della resistenza batteriche.

Il sistema CRISPR/Cas9 è stato utilizzato in riso per mutare il gene *eIF4G* che produce un effettore indispensabile per la replicazione del virus *RTSV* nell'ospite. L'approccio prevede l'utilizzo della cultivar *Oryza sativa* var. *indica* cv. *IR6*, ampiamente coltivata in tutta l'Asia tropicale. Questo approccio mostra che tramite il CRISPR si possono spegnere selettivamente i geni bersaglio senza modificare le caratteristiche della varietà oggetto di studio (Macovei et al., 2018).

Un altro caso importante per lo studio delle resistenze ai patogeni è relativo al locus di suscettibilità *Mildew Resistance Locus (TaMLO)* al fungo *Blumeria graminis* in *Triticum aestivum*. I loci *MLO* sono stati scelti come siti "targets" delle endonucleasi Cas9 perché i mutanti omozigoti con perdita di funzione avevano significativamente aumentato la resistenza alla *Blumeria* nell'orzo, in *Arabidopsis thaliana* e nel pomodoro. Con la tecnologia CRISPR/Cas9 sono stati prodotti mutazioni nell'esone 2 del gene che è conservato nei tre omeo-alleli del genoma del frumento (Wang et al., 2014). Le piante di frumento mutate con l'approccio CRISPR/Cas9 per *TaMLO* hanno mostrato una resistenza a largo spettro a *Blumeria graminis*. I mutanti *mlo* sono utilizzati per generare resistenze anche in specie non cerealicole come *Solanum lycopersicum* e *Vitis vinifera*.

Un ultimo caso di CRISPR "editing" per la resistenza ai patogeni riguarda il "knockout" di due geni per il miglioramento della resistenza al brusone di riso causato dal fungo *Magnaporthe oryzae*. Le piante resistenti sono state generate attraverso CRISPR/Cas9 mediante "knockout" dei geni *OsERF922* e *OsSEC3A* (Wang et al., 2016; Ma et al., 2018). Le piante mutanti di *Ossec3a* mancano di una subunità del complesso di esocitosi, presentano elevati contenuti in acido salicilico (SA), "up-regulation" dei geni correlati alla patogenesi e bassa taglia. I mutanti *Ossec3a* hanno complessivamente mostrato un numero ridotto di lesioni indotte da *Magnaporthe oryzae* nelle fasi iniziali dello sviluppo.

In mais, lo studio della resistenza ai patogeni è focalizzato principalmente sul marciume della spiga causato da *Fusarium verticillioides*, un fungo endemico in tutte le coltivazioni di mais delle regioni temperate che causa

perdite di produzione e accumulo di micotossine. L'approccio impiegato per incrementare la resistenza all'infezione fungina è basato sul "double CRISPR" in cui vengono individuati due siti da mutagenizzare per ogni gene bersaglio (Borrelli et al., 2018; Doll et al., 2018). I geni individuati sono coinvolti nel metabolismo degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e la produzione di ossilipine, metaboliti secondari coinvolti nel "cross-talk" pianta-patogeno. Il disegno molecolare adottato e la tecniche di trasformazione delle linee di mais sono cruciali per l'ottenimento di un processo di "editing" rapido da utilizzare nel miglioramento genetico e per lo studio delle interazioni pianta-patogeno.

Complessivamente, questi risultati dimostrano che il sistema CRISPR/Cas9 è un'applicazione potente e vantaggiosa per il miglioramento delle colture per quanto riguarda la resistenza ai patogeni. L'ottenimento di varietà resistenti potrebbe portare a una diminuzione importante nell'uso dei fitofarmaci in agricoltura. I vantaggi sono considerevoli in quanto si potrebbe idealmente migliorare il più ampio numero di varietà coltivate nelle diverse regioni italiane, mantenendo le caratteristiche di pregio e salvaguardando l'unicità dei prodotti.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia per le collaborazioni i gruppi di lavoro del Prof. Peter Rogowsky dell'École Normale Supérieure di Lione (ENS, Francia) e del Prof. Fabio Fornara dell'Università degli Studi di Milano.

RIASSUNTO

Le tecnologie del "genome editing" sono progredite rapidamente negli ultimi anni e per questo sono diventate uno dei più importanti strumenti per il miglioramento della resistenza ai patogeni nelle piante. Recentemente, sono emersi metodi per indurre modificazioni sito-specifiche mediante l'impiego di meganucleasi, nucleasi "a dito di zinco" (Zinc-Finger Nucleases, ZFN), nucleasi TALE (Transcription Activator-Like Effector Nucleases, TALEN) e nucleasi basate sul sistema Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Cas9 (CRISPR/Cas9). Il sistema CRISPR/Cas ha largamente superato le altre tecnologie di "genome editing", in quanto più semplice da utilizzare, presenta una maggiore probabilità di successo, è maggiormente versatile e meno costoso. Questa relazione si focalizza sui recenti sviluppi nella difesa delle piante contro le malattie causate da virus, batteri e funghi mediante l'impiego della tecnologia del CRISPR/Cas9, avendo come bersaglio il genoma dei patogeni o modificando geni di suscettibilità in specie come riso e frumento. Dopo anni trascorsi nella lettura e decodificazione dei genomi, i ricerca-

tori sono ora in grado di modificarli e riscriverli per sviluppare nuove colture resistenti a specifici parassiti e patogeni.

ABSTRACT

The genome editing technologies have progressed rapidly and become one of the most important genetic tools in the implementation of pathogen resistance in plants. Recent years have witnessed the emergence of site directed modification methods using meganucleases, zinc finger nucleases (ZFNs), transcription activator-like effector nucleases (TALENs), and clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9). CRISPR/Cas9 has largely overtaken the other genome editing technologies due to the fact that it is easier to design and implement, it has a higher success rate, and it is more versatile and less expensive. This review focuses on the recent advances in plant protection against virus, bacteria and fungal diseases using CRISPR/Cas9 technology in model plants and crops, targeting the pathogen genome or editing susceptibility genes in crop species such as rice and wheat. After spending years deciphering and reading genomes, researchers are now editing and rewriting them to develop crop plants resistant to specific pests and pathogens.

BIBLIOGRAFIA

- BORRELLI V.M.G., BRAMBILLA V., ROGOWSKY P., MAROCCO A., LANUBILE A. (2018): *The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology*, «Frontiers in Plant Science», 9, 1245.
- DOLL N.M., LAURINE M., GILLES L.M., GÉRENTES M.F., RICHARD C., JUST J., FIERLEJ Y., BORRELLI V.M.G., GENDROT G., INGRAM G.C., ROGOWSKY P., WIDIEZ T. (2018): *Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize*, «Plant Cell Reports», <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02378-1>.
- LI T., LIU B., SPALDING M.H., WEEKS D.P., YANG B. (2012): *High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice*, «Nature Biotechnology», 30, pp. 390-392.
- MA J., CHEN J., WANG M., REN Y., WANG S., LEI C. ET AL. (2018): *Distruption of Os-SEC3A increases the content of salicylic acid and induces plant defense responses in rice*, «Journal of Experimental Botany», 69, pp. 1051-1064.
- MACOVEI A., SEVILLA N.R., CANTOS C., JONSON G.B., SLAMET-LOEDIN I., CERMAK T. ET AL. (2018): *Novel alleles of rice eIF4G generated by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis confer resistance to Rice tungro spherical virus*, «Plant Biotechnology Journal», 16, pp. 1918-1927.
- WANG Y., CHENG X., SHAN Q., ZHANG Y., LIU J., GAO C. ET AL. (2014): *Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew*, «Nature Biotechnology», 32, pp. 947-952.
- WANG F., WANG C., LIU P., LEI C., HAO W., GAO Y. (2016): *Enhanced rice blast resistance by CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the ERF transcription factor gene OsERF922*, «PLoS One», 11, e0154027.
- ZHOU J., PENG Z., LONG J., SOSSO D., LIU B., EOM J.S. ET AL. (2015): *Gene targeting by the TAL effector PthXo2 reveals cryptic resistance gene for bacterial blight of rice*, «Plant Journal», 82, pp. 632-643.