

Giornata di studio:

Potenzialità della tecnologia genome editing
per la difesa delle piante

Firenze, 5 dicembre 2018

Alla giornata di studio sono intervenuti:

Michele Stanca – *Il miglioramento genetico da Mendel all'editing del genoma*

Francesco Licausi, Laura dalle Carbonare, Daan Weits, Beatrice Giuntoli – *CRISPR: la rivoluzione del ritocco genico*

Adriano Marocco, Virginia Borrelli, Alessandra Lanubile – *Uso dell'approccio CRISPR/Cas per lo studio della resistenza dei cereali ai patogeni*

Giovanni Vannacci, Sabrina Sarrocco, Isabel Vicente Muñoz, Luca Malfatti – *Alla frontiera della difesa delle colture: impiego del sistema CRISPR per il genome editing di funghi d'interesse fitopatologico*

Giuseppe Saccone, Angela Meccariello, Pasquale Primo, Gennaro Volpe, Fabiana D. Palmieri, Miriana Fabozzi, Germano Sollazzo, Simona Monti, Ennio Giordano, Valentino Gantz, Marco Salvemini – *Come produrre solo figli maschi mediante CRISPR/Cas9 e la RNAi in insetti dannosi in agricoltura*

Claudio Moser, Lorenza Dalla Costa, Lisa Giacomelli, Elena Baraldi, Mickael Malnoy – *Editing genomico in piante da frutto per la difesa dalle principali malattie*
Eleonora Sirsi – *Quale disciplina per l'editing genomico in agricoltura?*

Si pubblicano di seguito le relazioni pervenute.

Presentazione

La giornata è stata organizzata dai Comitati consultivi sui “Problemi della difesa delle piante” e per la “Biologia Agraria” dell’Accademia dei Georgofili, in collaborazione con il Dipartimento di Scienze Agrarie Alimentari e Agro-ambientali e il Corso di Laurea in Biotecnologie Vegetali e Microbiche dell’Università di Pisa.

Gli interventi hanno fatto il punto sulla ricerca italiana relativamente all’impiego della tecnica di editing genomico (EG) per difendere le piante da avversità biotiche e abiotiche al fine di mantenere produzioni di qualità con un minor impiego di sostanze chimiche, nel quadro della normativa italiana ed europea sugli organismi geneticamente modificati.

Con la tecnica EG è possibile intervenire su organismi viventi, quali piante, micro funghi e insetti, siano essi patogeni/parassiti o benefici, anche senza trasferimento di geni, che così tanta reazione ha causato sulla pubblica opinione, generando divisioni persino all’interno della comunità scientifica.

Si auspica che gli Atti di questa Giornata possano contribuire a evidenziare quanto i ricercatori stanno facendo per la sostenibilità dell’agricoltura, sperimentando sempre nuove tecniche nel rispetto dell’ambiente e della salute umana.

Amedeo Alpi
Comitato consultivo
per la “Biologia Agraria”

Piero Cravedi
Comitato consultivo sui
“Problemi della difesa delle piante”

Il miglioramento genetico da Mendel all'editing del Genoma

È ben noto come l'uomo prima del Neolitico non era in grado di prodursi il cibo e si comportava come tutti gli animali cacciando e raccogliendo frutti spontanei e radici per i suoi fabbisogni alimentari. Circa 14.000 anni or sono prima ancora dell'avvento dell'Agricoltura si hanno evidenze della costruzione del primo forno e l'uomo cuoce un impasto di semi schiacciati di orzo frumento, bacche e radici (Arranz-Otaegui et al., 2018). A seguito dei cambiamenti climatici dopo la fine dell'ultima glaciazione e in particolare dell'alternarsi delle stagioni l'uomo inventa l'Agricoltura: raccoglie i semi, li coltiva, li raccoglie e li conserva nei vasi di terracotta. Questa tecnologia si sviluppa nel Medio-Oriente 12.000 anni or sono e viene esportata alla velocità di un km /anno in tutta l'Europa e raggiunge l'Italia attraverso due grandi direttrici, il bacino del Mediterraneo e il Danubio (Cavalli Sforza, 2005; Stanca, 2017; Barbujani e Brunelli, 2018).

L'orzo e il frumento selvatici a quel tempo coltivati avevano la caratteristica di disperdere i semi: la spiga-*fragile* a maturazione si disarticolava ad ogni nodo del rachide, lasciando cadere i singoli chicchi in posizioni diverse sul terreno, così favorendo la crescita e maturazione delle nuove piante, avvantaggiate in ecosistemi naturali nella competizione con altre specie. Se dal punto di vista evolutivo questa strategia sviluppata dalla pianta rappresentava una valvola di sicurezza per la sopravvivenza della specie, dal punto di vista della produzione di cibo costituiva un punto debole, portando alla perdita totale del raccolto nel caso di improvvise calamità naturali (vento, pioggia). Tutte le specie a quel tempo avevano la caratteristica di disperdere i semi e il più grande salto scientifico-tecnologico si ebbe quando tra le piante

* UNASA-Accademia dei Georgofili

si scoprì e si coltivò quella a frutti *non fragili*. Fu la prima trasformazione genetica utile registrata nella storia (Stanca, 2017a).

La genetica che sottende questo carattere fondamentale della domesticazione è stata recentemente chiarita. In orzo, i due geni responsabili del carattere “spiga non fragile” sono *Btr1* e *Btr2*, strettamente associati sul cromosoma 3H, mentre in frumento svolgono un ruolo maggiore *brittle rachis 2* (*Br-A1*) e *brittle rachis 3* (*Br-B1*), rispettivamente posizionati sul braccio corto dei cromosomi 3A e 3B. Nell'insieme, sembra che in tutte le *Triticeae* siano presenti questi geni che controllano la disarticolazione in diversi punti della spiga. Un altro esempio è il gene *sh4* di riso, che codifica per un fattore trascrizionale responsabile della formazione del tessuto di abscissione alla base del peduncolo che regge il granello sulla pannocchia di riso. Nel riso coltivato la mutazione di un singolo nucleotide, che determina la sostituzione di una Lisina con una Asparagina, è sufficiente per ridurre lo sviluppo del tessuto di abscissione in modo tale da impedire la caduta spontanea dei semi, consentendo tuttavia il distacco dei semi a seguito di sollecitazione meccanica.

Nel processo di addomesticamento una caratteristica tenuta in gran conto è stata la dimensione dei frutti. Uno degli esempi più significativi è quello dell'olivo, con la transizione dalla forma selvatica – oleastro – a olivo coltivato da olio, che si caratterizza per l'incremento notevole delle dimensioni del frutto (drupa), processo verosimilmente controllato da poche mutazioni semplici.

Una profonda modifica dell'architettura della pianta e della morfologia della spiga del mais è stata causata dal gene *Teosinte branch1* (*Tb1*) che controlla lo sviluppo delle gemme laterali, determinando nel progenitore selvatico del mais (il teosinte) lunghe ramificazioni laterali terminanti con una infiorescenza maschile e numerosi germogli basali, caratteristiche assenti nel mais coltivato. *Tb1* codifica per un fattore trascrizionale che agisce da repressore dello sviluppo dei germogli laterali, imponendo una dominanza apicale.

Anche in specie orticole è stato molto evidente l'effetto di singole mutazioni su caratteristiche fondamentali dell'architettura della pianta e qualità dei frutti. In pomodoro, significativi sono stati gli effetti di alcuni geni, tra cui *self proning*, che trasforma lo sviluppo della pianta da indeterminato (ininterrotta crescita dell'apice vegetativo) a determinato (la crescita dell'apice vegetativo viene bloccata, ottenendo piante a sviluppo contenuto) e *jointless*, che controlla il sistema di disarticolazione della bacca dal peduncolo.

La bacca di pomodoro può assumere una varietà di colorazioni, che vanno dal giallo pallido al viola intenso, sino alla più recente scoperta dei mutanti a bacca nera: responsabili di questo fenomeno sono mutazioni in geni singoli,

quali *yellowflesh* (giallo), *dark green* (rosso intenso), *green flesh* (viola), *u* (uniformemente verde), *sun black* (nero), quest'ultimo regolato da due geni, *Aft* e *Atv*.

Negli agrumi quasi tutta la variazione naturale nella pigmentazione da antocianine, causata da mutazione puntiforme, delezioni e inserzioni di elementi trasponibili, può essere spiegata da differenze nell'attività del gene *Ruby* (Butelli et al., 2017). In pisello una mutazione puntiforme al gene *af* determina la trasformazione delle foglie in cirri.

La fase di addomesticamento continuò portando in coltura altre specie come lenticchia, fico, e parallelamente si cominciarono ad addomesticare gli animali come pecora, capra, bovini, suini e successivamente il cavallo. Con l'addomesticamento degli animali, la dieta si diversifica completamente e si completa. I binomi cereali-leguminose, cereali-latte e cereali-carne rappresentano la migliore combinazione nutritiva. Dopo la fase iniziale di addomesticamento, l'interazione tra la selezione naturale e una selezione antropica empirica ha portato allo sviluppo di popolazioni adattate ai diversi ambienti di coltivazione, note come *landraces*. Tuttavia queste *landraces*, dal periodo romano agli inizi del '900, non hanno provocato significativi incrementi produttivi per unità di superficie. Con la riscoperta delle leggi di Mendel, le prime conoscenze sulla genetica dei caratteri quantitativi e la scoperta dell'eterosi, si è affermata una vera attività di miglioramento genetico, che nel giro di pochi decenni ha radicalmente modificato la capacità produttiva e le caratteristiche qualitative delle piante coltivate. La genetica vegetale, madre di tutte le genetiche, ha consentito di approfondire le conoscenze sulla definizione dell'ereditarietà dei caratteri e nello stesso tempo ha permesso di sviluppare tecnologie nelle piante coltivate capaci di accumulare geni utili, originariamente dispersi nelle popolazioni, in genotipi superiori. Si avvia così un'intensa attività di miglioramento genetico, all'inizio del secolo scorso, che ha portato in tutte le specie coltivate allo sviluppo di nuove varietà sempre più produttive e sempre più rispondenti alle esigenze della moderna società. In generale, nell'ultimo secolo nella maggior parte dei Paesi si sono registrati, per tutte le specie coltivate e in particolare per i cereali, incrementi produttivi sorprendenti: grazie all'italiano Strampelli prima all'americano Borlaug dopo, i guadagni produttivi attribuibili al progresso genetico sono compresi tra 20 e 50 kg ha⁻¹ per anno. Questi cambiamenti sono associati a importanti modificazioni dell'architettura e della fisiologia della pianta, come evidente in orzo e frumento, in cui la riduzione dell'altezza della pianta, accompagnata da una maggior efficienza nell'assorbimento e nel trasporto, si è rivelata indissolubilmente collegata

all'aumento dell'*Harvest Index* (*indice di raccolto* HI = biomassa utile/biomassa totale).

Per ridurre l'altezza della pianta e quindi limitare o eliminare le perdite dovute al fenomeno dell'allettamento (perdita della posizione verticale del culmo in seguito ad avversi eventi meteorici) si fece ricorso ai geni della bassa taglia del frumento.

Questo grave fenomeno aveva sempre danneggiato le produzioni di granaia non solo dal punto di vista quantitativo, ma anche qualitativo. Le varietà coltivate sino all'inizio del XX secolo erano di taglia elevata (180 cm o più) e quindi facilmente soggette all'allettamento. Quando questo fenomeno si verificava precocemente, la pianta di frumento non aveva la capacità di recuperare la posizione eretta, e per diversi motivi tutta la fisiologia della relazione *source* (fotosintesi)-*sink* (accumulo dei fotosintati nel frutto) era alterata, con la conseguente produzione di cariossidi striminzite e malate. Comunque la potenzialità produttiva di quel modello di pianta era molto bassa: nelle condizioni migliori e in assenza di malattie non superava 2 t/ha. Nel 1911 Nazareno Strampelli per primo introdusse il carattere bassa taglia – *dwarf* – nei frumenti usando nei suoi incroci il genotipo giapponese AKAGOMUKI, portatore del gene *Rht8* sensibile alle gibberelline. Lo sviluppo di nuovi genotipi a bassa taglia rappresenta il grande successo italiano nel mondo. Le varietà di Strampelli sono state impiegate in quasi tutti i programmi di *breeding* in tutto il mondo sino a pochi anni or sono. Anche Cesare Orlandi utilizzò un'altra varietà a taglia bassa – SAITAMA 27 – portatrice del gene *Rht-B1d* insensibile alle gibberelline. Successivamente un'altra varietà giapponese, NORIN 10(6x), portatrice di un altro gene di bassa taglia *Rht-B1b* insensibile alle gibberelline, isolata per la prima volta nel 1932, fu introdotta nel 1946 da Orville Vogel nella Washington State University, e nel 1948 fu eseguito il primo incrocio. Norman Borlaug utilizzò Norin 10 nel 1955 per gli incroci, e nel 1964 avviò il nuovo programma di miglioramento genetico presso il CIMMYT (Messico), dal quale origina e si realizza la "Rivoluzione Verde", che gli porterà nel 1970 il premio Nobel per la pace. Va chiarito che il successo di questi nuovi genotipi a bassa taglia non derivò soltanto dall'eliminazione dei danni da allettamento, ma anche dagli effetti pleiotropici di questo gene. In pratica la presenza di *Rht-B1b* permette alla pianta di aumentare l'apparato fotosintetico, migliorare la fertilità della spigetta, il numero di spighe per spiga, il numero di spighe/m² e la dimensione della cariosside. Tutto ciò ha portato a un aumento della produzione pari a 4-5 volte il potenziale delle varietà pre-Strampelli (fino a 10-12 t/ha). Nel mondo l'incremento produttivo è stato notevole e si prevedono ancora progressi sostanziali sia in ambienti fertili che in ambienti stressati.

Con il gene *Rht-B1b* fu possibile programmare un nuovo ideotipo di pianta, basato sull'Harvest Index. Di fatto la potenzialità di biomassa totale non è cambiata tra i genotipi non *dwarf* e *dwarf*. È solo cambiato l'HI e ciò dimostra che tutta la genetica dei *dwarf* ha migliorato la relazione *source-sink* e ha equilibrato il rapporto assorbimento/fotosintesi e trasporto/accumulo dei fotosintati nei siti definitivi (Stanca et al., 2014).

Il modello di pianta, il cosiddetto "Ideotipo", nel quale deve instaurarsi un ottimale rapporto tra sorgente di energia "fotosintesi" e siti di accumulo (frutto) è stato esportato e applicato in altre specie vegetali. Al miglioramento genetico classico si è affiancata la mutagenesi sperimentale per l'ottenimento di nuove varietà. La mutagenesi indotta nel settore vegetale ha un ruolo di rilievo non solo per lo studio delle funzioni geniche, ma anche, soprattutto in un recente passato, per indurre variabilità genetica da cui selezionare nuovi genotipi di potenziale interesse agrario. Con questa tecnologia, negli anni '60 -'70 sono state rilasciate diverse nuove varietà di specie erbacee, arboree e ornamentali.

FEEDINGTEN BILLION: CON I RISULTATI FIN QUI RAGGIUNTI
SI PUÒ PENSARE DI ALIMENTARE IL PIANETA NEI PROSSIMI 40 ANNI,
QUANDO LA SPECIE UMANA SUPERERÀ I 9.5 MILIARDI DI INDIVIDUI?

La genetica ha visto crescere intorno a sé diverse discipline che hanno contribuito ad approfondire le conoscenze sulla ereditarietà dei caratteri, ma è con l'avvento della genomica che si comincia ad avere una visione molto più ampia e precisa della struttura e funzione di singoli geni, dei genomi, e di come questi possano essere assemblati in genotipi superiori. L'analisi dei genomi è stata la maggiore conquista della genetica moderna per lo studio della struttura e funzione dei singoli geni e dell'intero genoma degli esseri viventi, fondamentale anche per comprenderne le dinamiche evolutive e sviluppare ulteriori biotecnologie al fine di migliorare specie vegetali per caratteri utili. Sono oggi disponibili le sequenze genomiche ad alta qualità di specie modello quali *Arabidopsis* e *Brachypodium*, oltre a quelle di specie di elevato interesse agronomico quali riso, mais, vite, melo, pioppo, caffè, patata, pomodoro, carciofo, orzo, frumento tenero, duro e *dicoccoides*. I ricercatori italiani hanno contribuito in maniera determinante all'ottenimento di questi risultati.

Tra i genomi di maggiore complessità si annovera quello del frumento tenero (*Triticum aestivum*, $2n = 6x = 42\text{-AABBDD}$) (tab. 1), stimato in 17 miliardi di bp, pari a cinque volte il genoma umano e a circa quaranta volte

SPECIE	DIMENSIONE GENOMA (MILIONI DI BP)*	NUMERO DI GENI	RIVISTA	ANNO
Arabidopsis	125	26.500	Nature	2000
Mais	2.000	32.000	Science	2009
Riso	430	37.544	Science	2002
Vite	475	30.434	Nature	2007
Pomodoro	900	35.000	Nature	2012
Patata	844	39.031	Nature	2011
Frumento tenero	17.000	124.000	Science	2014-2018
Frumento dicoc- coide e duro	10.500	67.185	Science-Nature Gen	2017-in press
Orzo	5.000ww	39.734	Nature	2017
Arancio	300	25.000	Nature Biotech.	2014
Pesco	265	27.852	Nature Gen.	2013
Melo	742	57.386	Nature Gen.	2010
Quinoa	1.450-1.500	33.365	Nature	2016
Fusarium langsethiae	37.5	12.232	I.J. Food. Microbiol.	2016
Pioppo	520	41.000	Science	2006
Melanzana	833	38.498	DNA Research	2014
Melone	450	27.427	PNAS	2012
Brachypodium	220	36.477	Nature	2010
Soia	1.100	46.430	Nature	2010
Carciofo	1.084	38.726	Nature	2016
Barbabietola	714-758	27.421	Nature	2013
Asparago	1.300	27.334	Nature comm.	2017
* Paia di basi (da Stanca 2017)				

Tab. 1 *Dimensione dei Genomi di alcune specie vegetali e di un fungo micotossigenico «Fusarium»*

quello del riso. È caratterizzato dalla presenza di elementi ripetuti per circa l'80%. Si stima che soltanto nel cromosoma 5A siano contenuti da cinque a seimila geni (Vitulo et al., 2011; Marcussen et al., 2014; Mayer et al., 2014; Maccaferri et al., in press.). Lo sviluppo della genomica delle piante coltivate sta cambiando profondamente le strategie di ricerca nell'ambito della genetica vegetale e avrà un forte influenza sull'agricoltura moderna. L'avvento dei marcatori molecolari ha consentito di definire la base genetica dei caratteri qualitativi e quantitativi (QTL), di stabilire le relazioni di sintenia tra i genomi (quota del genoma condiviso tra specie vicine o lontane), di verificare i meccanismi genetici che controllano l'eterosi in specie quali il mais. La selezione assistita con marcatori molecolari (*Molecular Assisted Selection* - MAS) per caratteri qualitativi è una realtà ormai diffusa anche presso le grandi ditte sementiere private. Lo sviluppo di una nuova classe di marcatori

molecolari (*Single Nucleotide Polymorphism SNP*) ha consentito di automatizzare ed estendere più di quanto sia stato fatto finora le applicazioni basate sui marcatori molecolari, ad esempio sviluppando approcci di *Whole Genome Association Mapping*.

Gli obiettivi attuali sono rivolti a convogliare gli sforzi delle diverse discipline scientifiche verso lo sviluppo di tecnologie mature per l'agricoltura del futuro, a garanzia di produzione di alimenti per tutti. Se consideriamo il frumento, risulta evidente che le nuove varietà e le nuove tecniche agronomiche, in alcuni Paesi europei, hanno permesso di raggiungere una media nazionale superiore a 8 t/ha con una potenzialità di 12-14 t/ha, cioè sono stati ottenuti circa 20.000 semi/m² di terreno senza intensificare l'uso di prodotti di sintesi. Oggi si può dire che teoricamente è possibile raggiungere 30.000 semi/m² e superare la barriera delle 15 t/ha. Tuttavia, come noto, eventi sfavorevoli durante il ciclo biologico riducono drasticamente lo sviluppo, la crescita, la fertilità, l'allegagione dei fiori e la dimensione dei frutti (Sakuma et al., 2019). La conoscenza dei meccanismi che regolano l'architettura della pianta, molto spesso mediata da un controllo ormonale, sono fondamentali per i nuovi ideotipi di pianta per il futuro. In genere gli studi sono stati rivolti principalmente a fisiologia, metabolismo e genetica della parte aerea delle piante. Oggi tuttavia una maggiore attenzione viene rivolta alle radici, per migliorare l'efficienza d'uso dell'acqua (*Water Use Efficiency*), dell'azoto (*Nitrogen Use Efficiency*), del Fosforo (*Phosphorus Use Efficiency*), alla resistenza al freddo (*Cold Responsive Genes*), alle proprietà fisico-chimiche e biologiche del suolo e al loro impatto sulla resistenza alle malattie da funghi, batteri, virus e insetti, in modo da disegnare un moderno sistema integrato (IPM: *Integrated Pest Management*) per mettere i nuovi genotipi di pianta nella migliore condizione di crescita. Sono in atto in pieno campo i primi esperimenti di simulazione dell'incremento della CO₂ nell'atmosfera (FACEFreeAirCarbon-DioxideEnrichment), che si prevede passerà dalle 380ppm attuali a 600ppm nel 2050, per verificare l'effetto sulla fotosintesi e qualità dei prodotti (Verrillo et al., 2017). Non trascurabile è anche il tema che vede il sistema produttivo agrario non più basato sul trinomio Pianta-Atmosfera-Suolo ma piuttosto sul quadrinomio Pianta-Atmosfera-Suolo- Microrganismi che vivono intorno o dentro le radici. Questa nuova visione ha stimolato la nascita di *network* per monitorare l'evoluzione del metagenoma al variare dei diversi sistemi colturali e degli ambienti, e come questo possa influenzare la vita delle specie agrarie e selvatiche e l'assorbimento degli elementi nutritivi come il fosforo (Castrillo et al., 2017). Si ipotizza già che la *performance* di specie di piante e di genotipi entro specie dipenderà anche dagli inoculi microbici, specifici

per l'esaltazione di determinati caratteri, che interagiscono con gli elementi fisico-biochimici del suolo e con il microbioma naturale in specifiche condizioni (Bulgarelli et al., 2015).

Le nuove sfide della moderna genetica, per contribuire ad alimentare l'umanità, si baseranno sempre più sulla ricerca di base e l'innovazione tecnologica, in particolare quella derivata dalle discipline "omiche", tra cui si sta affermando non solo in campo vegetale ma più intensamente in campo microbico, animale e umano l'editing del genoma, e sulla velocità con cui queste nuove tecniche raggiungeranno l'azienda agraria.

Ne consegue che la scienza applicata all'agricoltura rappresenta il motore dell'aggiornamento ed è direttamente coinvolta nel disegnare i nuovi orizzonti dell'agricoltura, dell'alimentazione e dell'ambiente, partendo dal presupposto che, come ben noto, sarà necessario raddoppiare la produzione di cibo entro il 2050 senza causare danni all'ambiente, e concorrere con colture specializzate a produrre energia, farmaci, polimeri e altre sostanze importanti per la medicina e l'industria. L'aumento delle produzioni agricole, la stabilità delle produzioni, la qualità dei prodotti e la loro tracciabilità, il rispetto delle regole delle razionali pratiche agricole dettate dall'innovazione tecnologica (che si basa sulla conoscenza=sostenibilità) sono gli imperativi ai quali l'agricoltura moderna deve far fronte per garantire cibo a sufficienza all'uomo e agli animali in allevamento.

RIASSUNTO

Lo sviluppo di un'agricoltura sostenibile è strettamente legato alla riduzione dell'uso dei pesticidi e a una maggior efficienza nell'uso dei fertilizzanti, dei fitofarmaci e delle risorse idriche. Ciò richiede lo sviluppo di nuove varietà di piante con minori esigenze di fertilizzanti e dotate di resistenze genetiche verso gli agenti patogeni e i fattori di stress ambientale. Con le tecniche proprie dell'analisi genomica (uso estensivo di marcatori molecolari, sequenziamento dei geni e genomi, analisi globale dell'espressione genica, analisi del proteoma e delle sue modificazioni, analisi globale dei metaboliti) è possibile studiare i genomi, intesi come insieme di geni e proteine che interagiscono tra loro, e comprendere i meccanismi che regolano il metabolismo cellulare sino a determinare l'espressione fenotipica che rappresenta, in ultima analisi, il valore agronomico e alimentare delle piante coltivate. Proprio la capacità della genomica di risalire alle basi genetiche dei caratteri agronomici rende questa scienza strategica per il miglioramento delle specie vegetali e per adattare alle mutate esigenze del consumatore (alimenti più sicuri, di maggiore valore qualitativo e nutrizionale, ecc.) e della società (piante come fonti energetiche ed altri prodotti non-food).

Negli ultimi anni si è assistito a un incremento esponenziale delle conoscenze relative ai genomi delle piante (globalmente definite con il termine "genomica"). Attraverso

l'uso di marcatori molecolari sono stati studiati i rapporti filogenetici tra le specie, è stata descritta la biodiversità, sono stati localizzati sul genoma geni utili al fine di un loro trasferimento guidato nelle varietà coltivate attraverso la nuova tecnologia dell'Editing del Genoma. Tuttavia la Corte di Giustizia Europea ha deliberato che il GE deve essere regolato esattamente dalla legislazione GMO.

ABSTRACT

Historically, genetic studies have their foundations in Mendelian mutants, characterized by altered physiology and morphology. In this regard there are examples of morphological mutations described in the past for which the gene/genes responsible have been recently cloned, characterized and used. An example is the Rht-B1b gene that controls plant height in wheat, which induces semidwarf plants due to the effect of a single nucleotide mutation capable of converting the majority of sugar into grain starch. With this model the source-sink relationship has been studied in depth and new varieties based on the concept of "Improved Harvest Index" have been released with an impressive grain yield enhancement in a wide range of environments. The question is: "Can we produce and supply sufficient food in the next 40 years without consuming more land?" On the basis of modern plant science, particularly by the introduction of genomic studies, including genome editing, the answer is positive. Selection is specifically directed to create highly tolerant and/or resistant genotypes to increase the "High Yield Potential and Stability of Yield" and to reduce the gap between high yield potential and the actual yield. However the possibility to apply the new genome editing technology has not been approved by the Court of Justice of European Union by subjecting GE to the same GMO Directive as plants derived from transgenesis.

BIBLIOGRAFIA

- ARRANZ-OTAEGUI A., GONZALEZ CARRETERO L., RAMSEY M.N., FULLER D.Q. AND RICHTER T. (2018): *Archaeobotanical evidence reveals the origins of bread 14,400 years ago in northeastern Jordan*, «PNAS», July 31, 115 (31), pp. 7925-7930.
- BARBUJANI G. AND BRUNELLI A. (2018): *Il giro del mondo in sei milioni di anni*, il Mulino, Bologna, pp. 1-197.
- BULGARELLI D., GARRIDO-OTER R., MUNCH P.H. ET AL. (2015): *Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley*, «Cell Host Microbe», 17, pp. 1-12.
- CAVALLI SFORZA L. e F. (2005): *Perché la scienza. L'avventura di un ricercatore*, Mondadori, Milano, p. 393.
- MACCAFERRI M. AND CATTIVELLI L. (in press): *Durum wheat genome reveals past domestication signature and future movement targets*, «Nature Genetics».
- MARCUSSEN T. ET AL. (2014): *International Wheat Genome Sequencing Consortium. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat*, «Science», 345, n. 6194, 1250092.
- MAYER K.FX., ROGERS J., DOLEŽEL J., POZNIAK C., EVERSOLE K., FEUILLET C., GILL B., COLAIACOVU M., FACCIOLI P., STANCA A.M., CATTIVELLI ET AL. (2014): *A chro-*

- mosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (Triticum aestivum) genome*, «Science», 345 (6194), 1251788, 2014.
- SAKUMA AND TAKAO KOMATSUDA (2019): *Unleashing floret fertility in Wheat through the mutation of a homeobox gene*, «PNAS».
- STANCA A.M., MAROCCO A., PECCHIONI N., VALÈ G., ODOARDI M., FACCIOLI P., CATTIVELLI L., TERZI V. (2014): *Genetica Vegetale*, in *Genetica*, S. Pimpinelli ed., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp. 155-221.
- STANCA A.M., FRANCA E., TONDELLI A., BADECK F.W., TERZI V. (2017): *Progress in small grain cereals: a case study*, in R. Pilu and G. Gavazzi (eds.), *More food: road to survival*, BSPPubl, chapter 17, pp. 578-604.
- STANCA A.M. (2017): *La genetica vegetale sarà pronta per assicurare alimenti alla popolazione mondiale del 2050?*, «Analysis», 2.
- STANCA A.M., FRANCA E., TONDELLI A., BADECK F.W., TERZI V. (2017): *Progress in small grain cereals: a case study*, in R. Pilu and G. Gavazzi (eds.), *More food: road to survival*, BSPPubl, chapter 17, pp. 578-604.
- VERRILLO F., BADECK F.W., TERZI V., RIZZA F., BERNARDO L., DI MARO A., FARES C., ZALDEI A., MIGLIETTA F., MOSCHELLA A., BRACALE M., VANNINI C. (2017): *Elevated field atmospheric CO₂ concentrations affect the characteristics of winter wheat (cv. Bologna) grains*, «Crop & Pasture Science», 68, pp. 713-725.
- VITULO N. ET AL. AND STANCA A.M. (2011): *First survey of the wheat chromosome 5A composition through a next generation sequencing approach*, «PloSONE», 6 (10): e26421.

CRISPR: la rivoluzione del “ritocco genico”

La modifica di precise sequenze di materiale genetico in vivo ha rappresentato per anni il “sacro Graal” per la ricerca in ambito biologico. Numerosi tentativi, con diversi gradi di successo, sono stati fatti equipaggiando enzimi endonucleasi con domini di legame al DNA in grado di riconoscere specifiche sequenze (meganucleasi, nucleasi a dita di zinco [ZFN] e nucleasi effettori simili ad attivatori trascrizionali [TALEN]) (Wang et al., 2016). La maggiore limitazione di queste strategie è però rappresentata dalla necessità di dover sintetizzare e ottimizzare una sequenza proteica per assicurare specificità ed efficienza di taglio, escludendo quindi applicazioni su larga scala. La strategia CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), nata come applicazione delle scoperte in materia di risposta antivirale in procarioti, ha superato tali limitazioni (Jinek et al., 2012). Questa tecnologia localizza specifiche endonucleasi Cas (CRISPR associated protein) mediante (1) un’interazione diretta fra la proteina e una corta sequenza di DNA (motivo vicino al protospaziatore (PAM)) ma soprattutto (2) in virtù dell’accoppiamento di basi fra una corta sequenza di RNA, definita “guida” o gRNA, e il DNA bersaglio (fig. 1). Il principio su cui è basato CRISPR-Cas, espande enormemente la possibilità agire su uno o più specifici siti genomici; fino ad ora è stato utilizzato per tagli di singoli o doppi filamenti, sostituzione di basi, regolazione della trascrizione, ma numerose altre attività enzimatiche possono essere sfruttate (Adli, 2018). Al taglio operato dall’endonucleasi Cas può seguire riparazione mediante congiunzione delle estremità non basata su omologia (NHEJ) che, in quanto soggetta a errori, può introdurre mutazioni

* Dipartimento di Biologia, Università di Pisa

** Istituto di Scienze della Vita, Scuola Superiore Sant’Anna

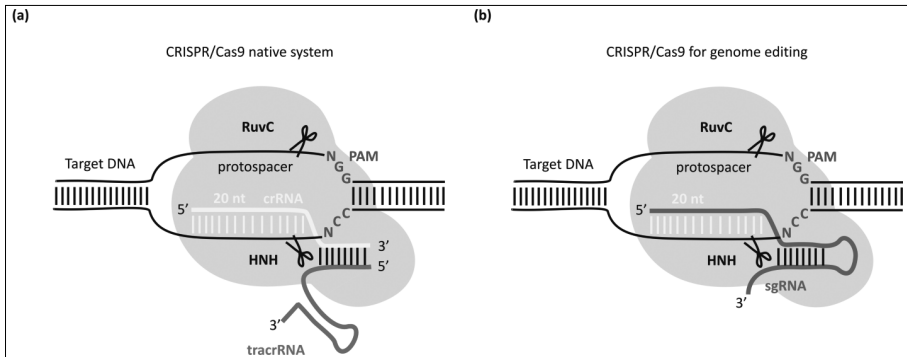


Fig. 1 Features of the CRISPR/Cas9 system (a) Schematic representation of the type II CRISPR/Cas9 in its native system. The Cas9 enzyme consists of two cleavage domains, RuvC and HNH. The target sequence of 20 nt on the genomic target, called protospacer, is recognized by a complementing RNA, crRNA, which has to be stabilized by the tracrRNA fragment in order to be loaded on the Cas9. The presence of the downstream protospacer adjacent motif (PAM) is a prerequisite for DNA cleavage by the Cas9 complex. (b) The system described in (a) was optimized for genome editing applications fusing the crRNA and tracrRNA fragment into the chimeric sgRNA. Scheme adapted from Bortesi and Fischer, (2015).

Fig. 1 Caratteristiche del sistema CRISPR/Cas9 (a) Rappresentazione schematica del sistema originale di tipo II CRISPR/Cas9. L'enzima Cas9 è composto di due domini di taglio RuvC e HNH. La sequenza di 20 nt sul bersaglio genomico, detta protospaziatrice, viene riconosciuta da un RNA complementare, crRNA, che viene caricato sull'enzima Cas9 attraverso il frammento tracrRNA. La presenza di un motivo adiacente al protospaziatore (PAM) è un requisito per il taglio del DNA da parte di Cas9. (b) Il sistema descritto in (a) è stato ottimizzato per applicazioni di modifica genomica fondendo crRNA e tracrRNA nel sgRNA chimerico. Schema adattato da Bortesi and Fischer, (2015).

missenso, non senso o vere e proprie inserzioni/delezioni. Alternativamente, se viene fornita una sequenza le cui estremità presentino omologia con quelle prodotte dal taglio, questa può essere utilizzata come stampo per la riparazione, sostituendo la regione originale oppure introducendo una nuova porzione di DNA. Fino a oggi, la maggioranza delle applicazioni di CRISPR a specie vegetali sia per scopo di ricerca che applicativi hanno sfruttato il primo meccanismo di riparazione, sebbene alcuni approcci di ricombinazione omologa guidata abbiano avuto esito altrettanto positivo. Recentemente, anche approcci di sostituzioni mirate di basi azotate sono stati tentati con successo (Ramasamy et al., 2018).

Le principali limitazioni di questa rivoluzionaria strategia sono rappresentate dall'efficienza di indirizzamento del complesso ribonucleoproteico e dalla localizzazione in posizioni indesiderate del genoma (in inglese “off-targets”). In anni recenti numerose modifiche sono state introdotte per aumen-

tare l'efficienza e la specificità della tecnologia CRISPR, sfruttando proteine Cas provenienti da diversi batteri oppure operando opportune modifiche in quella principalmente utilizzata, proveniente da *Streptococcus pyogenes* (Sp). Specificamente nell'ambito della biologia delle piante, l'introduzione stessa del complesso Cas-gRNA nelle cellule vegetali rappresenta un passaggio limitante, in quanto fortemente condizionato dalle possibilità di trasformazione e rigenerazione della specie di interesse.

Sulla base delle limitazioni sopraelencate, riteniamo che i seguenti quattro aspetti dovrebbero essere considerati nel caso venga pianificata una strategia di mutagenesi mediante CRISPR-Cas.

Per prima cosa, è necessario identificare con precisione la regione genomica bersaglio. Questo può essere semplice per approcci di genetica inversa, ovvero quelli nei quali si intendano esplorare le conseguenze fenotipiche di una mutazione che inattivi una porzione genica definita. In questo caso, è opportuno indirizzare la modificazione su esoni, in particolare il primo o quelli codificanti per regioni conservate. Qualora si miri a ottenere un ben determinato fenotipo sfruttando la genetica inversa, sarà opportuno valutare i geni candidati e rintracciarne o inferirne (sulla base delle informazioni di letteratura, oppure di analisi di sequenza genica o proteica) le mutazioni con il maggior potenziale causativo. Particolare attenzione dovrebbe essere prestata laddove i geni candidati individuati in tal modo appartengano a famiglie geniche, oppure quando ci si applichi a specie poliploidi, a causa della possibile complementazioni da parte di sequenze funzionalmente ridondanti. Fortunatamente, al giorno d'oggi, le sequenze dei genomi o almeno dei trascrittomi di numerose specie vegetali sono depositate presso basi di dati accessibili. A causa della variabilità intraspecifica è comunque consigliabile un ri-sequenziamento della regione bersaglio prima di intraprendere la progettazione dei gRNA.

In questa seconda fase, è consigliabile l'utilizzo di algoritmi bioinformatici dedicati (oggi anche liberamente disponibili in rete) per il controllo e l'analisi delle numerose variabili strutturali che possono condizionare l'efficienza di modificazione dei loci genomici prescelti. Fra queste vale la pena elencare la presenza di regioni genomiche con parziale omologia di sequenza, che rappresentano potenziali off-target, la lunghezza del gRNA, la sequenza del PAM, entrambe dipendenti dal tipo di Cas impiegata e, infine, la presenza di siti di restrizioni in prossimità del PAM che possano agevolare l'identificazione dell'avvenuta mutazione.

Una volta definita la sequenza che fungerà da gRNA, questa dovrà essere clonata all'interno di un vettore di espressione efficace nell'espressione del com-

plesso riboproteico. Generalmente, viene sfruttato per l'espressione del gRNA un promotore di RNA ribosomali, trascritto da RNA polimerasi III. La scelta del promotore del gene Cas è, invece, fortemente determinata dalla strategia di trasformazione della specie: ubiquitario e costitutivo nel caso in cui venga sfruttata la rigenerazione in vitro, oppure specifico per gameti o precoci stadi embrionali nel caso in cui la trasformazione abbia luogo durante l'impollinazione, mediante la tecnica dell'immersione florale. Più cassette codificanti per gRNA possono essere assemblate in serie in modo da dirigere molteplici mutazioni allo stesso tempo. Inoltre, il marcatore di selezione conferito dal vettore al materiale vegetale trasformato (marcatore che è generalmente associato a fluorescenza o alla resistenza a sostanze citotossiche) dovrebbe essere scelto in modo da minimizzare le operazioni di identificazione dei transgenici. È opportuno menzionare la possibilità di trasferimento diretto del complesso nucleoproteico in cellule protoplastizzate, seguito da rigenerazione di intere piante. Tuttavia questa strategia, che supera la necessità di transgenesi, è tecnicamente complessa e può stimolare l'insorgere di mutazioni somatiche. Infine l'identificazione di individui in cui sia avvenuta la mutazione può avvenire direttamente mediante amplificazione e sequenziamento della regione bersagliata, oppure attraverso una prima analisi di restrizione, qualora un idoneo sito di riconoscimento per endonucleasi sia presente a valle del PAM. Se la mutazione è stata ottenuta mediante espressione stabile di Cas e gRNA, è successivamente consigliabile eliminare la sequenza codificante per entrambi, mediante incrocio con individui selvatici e seguendo la segregazione dei transgeni rispetto alla mutazione indotta. Questo può rappresentare una notevole limitazione nel caso di piante che richiedono lungo tempo prima di acquisire competenza riproduttiva.

In conclusione, la strategia CRISPR rappresenta un notevole avanzamento tecnico, applicabile a numerosi ambiti della biologia, incluso lo studio delle piante. Sebbene sia facilmente applicabile come semplice avanzamento rispetto alle ormai tradizionali tecniche di transgenesi, richiede un'accorta pianificazione dell'approccio, che includa un esame accurato di diversi aspetti biologici e tecnici che possono influire sul risultato finale. Il fiorire di tecniche accessorie di modificazione nucleotidica arricchirà senza dubbio il portafoglio di strumenti disponibile per i biologi vegetali del futuro.

ABSTRACT

Site-directed editing of genomic regions is a powerful tool to study biological processes as well as to obtain desired phenotypes in eukaryotic organisms. It is not surprising that its

application in plant biology has blossomed in the recent years. Among the strategies aimed at directing endonucleases to specific genomic targets, the CRISPR-Cas technology is the mostly employed due to its efficiency and simplicity of engineering. This strategy is commonly used to either induce inactivating mutations or, in a more complex approach, to replace regions of interest to alter the properties of plant species of interest. To effectively apply CRISPR-Cas for plant mutagenesis, special care has to be taken when selecting the sequence to be mutagenized, the delivery of the ribonucleoproteic complex and the selection procedure. Nevertheless, CRISPR-Cas represent a priceless tool in the hands of the new generation of plant biotechnologists and breeders.

BIBLIOGRAFIA

- ADLI M. (2018): *The CRISPR tool kit for genome editing and beyond*, «Nature Communications», 9, 1911.
- JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I., HAUER M., DOUDNA J. A., CHARPENTIER E. (2012): *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*, «Science», 80, pp. 816-821.
- RAMASAMY K., JAYABALAN S., SELLAMUTHU G., JAGANATHAN D., VENKATARAMAN G. (2018): *CRISPR for Crop Improvement: An Update Review*, «Front. Plant Sci.», 9, p. 985.
- WANG H., LA RUSSA M., QI L.S. (2016): *CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond*, «Annu. Rev. Biochem.», 85, pp. 227-264.
- CUI Y., XU J., CHENG M., LIAO X., PENG S. (2018): *Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools*, «Interdiscip Sci Comput Life Sci», 10, 455.

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.

Alla frontiera della difesa delle colture: impiego del sistema CRISPR per il genome editing di funghi d'interesse fitopatologico

INTRODUZIONE

La selezione di isolati potenzialmente utilizzabili come agenti di lotta biologica è un processo lungo e costoso che parte dalla loro identificazione fino alla caratterizzazione morfologica, fisiologica e genetica e non può limitarsi a una sperimentazione solo su scala di laboratorio, ma necessita di numerose prove in pieno campo. La lotta biologica è possibile non solo attraverso l'impiego di antagonisti appartenenti a specie differenti rispetto a quelle dei patogeni da contrastare, ma anche, e in modo altrettanto efficace, attraverso l'impiego di isolati avirulenti del patogeno capaci di indurre resistenza nella pianta nei confronti degli isolati virulenti oppure in grado di competere per i nutrienti o per i siti d'infezione (Ghorbanpour et al., 2018).

Questa ultima strategia appare estremamente promettente e già dal 1983 sono noti, ad esempio, isolati non-aflatossigenici di *Aspergillus flavus* efficaci nel controllare lo sviluppo di ceppi aflatossigenici su granella di mais, alcuni dei quali già utilizzati come principio attivo di prodotti disponibili in commercio (Mauro et al., 2018). Oltre all'isolamento e alla selezione di isolati naturali con caratteristiche utili per il controllo dei patogeni (come nel caso di *A. flavus*), è possibile modificare geneticamente isolati virulenti, silenziandone alcuni geni in modo veloce e mirato, al fine di ottenere nuovi genotipi, avirulenti e in grado di competere con i ceppi virulenti impiegabili come agenti di lotta biologica. Tuttavia, le classiche tecniche di silenziamento genico prevedono generalmente l'inserzione di DNA estraneo nel genoma dell'organismo bersaglio, sistema che comporta la creazione di

* Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-ambientali, Università di Pisa

organismi geneticamente modificati che non possono essere utilizzati in pieno campo.

L'EDITING GENOMICO NEI FUNGHI: STATO DELL'ARTE

E POTENZIALI APPLICAZIONI NELLA GESTIONE DELLE MALATTIE DELLE PIANTE

La messa a punto della tecnica CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR Associated protein 9) ha fornito ai ricercatori uno strumento per ritoccare il genoma di diversi organismi in un modo preciso e senza l'inserimento di sequenze estranee di DNA. Questa nuova tecnologia permette, inoltre, di ottenere mutanti silenziati in uno o più geni, riducendo i tempi e i costi delle classiche procedure di silenziamento genico (Knott and Doudna, 2018). Sebbene, al momento, l'applicazione di questa tecnica nei funghi filamentosi (alcuni dei quali di interesse agrario) consista per lo più in una dimostrazione dell'applicabilità del sistema di editing genomico in questi organismi, l'impiego della CRISPR-Cas9 nei funghi di interesse fitopatologico consentirebbe di ottenere, tramite mutagenesi mirata, isolati avirulenti, privi di DNA esogeno, utilizzabili come competitori dei ceppi virulenti o come induttori di resistenza nelle piante, quali strumento innovativo nella gestione delle malattie. Inoltre, potrebbe essere possibile anche editare il genoma di isolati benefici, già utilizzati in lotta biologica, al fine di migliorarne le capacità antagonistiche (Vicante Muñoz et al., 2019).

Uno scenario possibile per l'ottenimento e l'applicazione di mutanti potenziali agenti di lotta biologica attraverso la CRISPR-Cas9 potrebbe essere il *Fusarium Head Blight* (Fusariosi della spiga di frumento o FHB), una delle più importanti malattie che colpiscono i cereali, causata da diverse specie fungine appartenenti al genere *Fusarium* spp., con *F. graminearum* e *F. culmorum* tra le più aggressive. L'importanza della fusariosi della spiga non è correlata solo con le ingenti perdite, in termini quantitativi, della produzione di granella, ma soprattutto con il rischio di contaminazione da micotossine, in particolare i tricoteceni, quali il deossinivalenolo (DON). Questo metabolita secondario fungino non solo è pericoloso, se ingerito, per l'uomo e gli animali ma è anche un noto fattore di virulenza il cui silenziamento – fino a oggi ottenuto con tecniche classiche di ingegneria genetica – diminuisce l'aggressività degli isolati patogeni nei confronti dell'ospite vegetale. L'impiego in campo di mutanti di *F. graminearum* e *F. culmorum* avirulenti, ottenuti con la tecnica CRISPR-Cas, potrebbe aiutare nel controllo dell'incidenza del FHB attraverso la competizione con i ceppi patogeni, approccio simile a quanto

viene fatto oggi con i ceppi non micotossigeni di *A. flavus*. Inoltre, la colonizzazione dell'ospite vegetale da parte degli isolati editati potrebbe conferire alla pianta protezione nei confronti anche di altri patogeni.

Come precedentemente accennato, un altro potenziale contributo della tecnica CRISPR-Cas9 a una più efficace gestione delle malattie, potrebbe essere l'impiego di funghi benefici con una migliorata capacità antagonista ottenuta attraverso il ritocco genico. È il caso di *Trichoderma*, un genere fungino che include numerosi isolati noti agenti di lotta biologica in grado di ridurre l'incidenza di molte malattie, non solo attraverso un'azione diretta nei confronti dei patogeni, attività mediata anche dalla produzione e rilascio di metaboliti secondari ad attività antifungina, ma anche inducendo resistenza nelle piante (Sarrocchio et al., 2017). Modifiche genetiche delle vie metaboliche che portano alla produzione e rilascio di proteine e metaboliti secondari potrebbe fornire nuovi ceppi fungini con un'aumentata attività di biocontrollo. Utilizzando la tecnica CRISPR-Cas9, è possibile indurre l'attivazione di cluster sconosciuti, o reprimere cluster conosciuti, permettendo così la scoperta di nuove caratteristiche fenotipiche in grado di interagire con la pianta e/o con i patogeni consentendo l'ottenimento di nuovi e interessanti agenti di lotta biologica. Il loro utilizzo in pieno campo sarebbe scevro di quegli inconvenienti insiti nell'impiego di organismi geneticamente modificati secondo le tecniche classiche dell'ingegneria genetica, quali l'introduzione di transgeni nell'ambiente.

RIASSUNTO

I funghi fitopatogeni sono i responsabili di circa un terzo delle malattie che colpiscono, nel mondo, le piante e che comportano, ogni anno, ingenti perdite in termini di resa e qualità della produzione agricola. A causa della diffusione e dell'incidenza di queste malattie diventa sempre più urgente ricorrere a nuove strategie che ne favoriscano la gestione. La difesa biologica, può prevedere l'impiego di antagonisti microbici non patogeni o prodotti derivati dal loro metabolismo e rappresenta una alternativa ecosostenibile all'impiego di sostanze chimiche. In questo contributo verranno analizzate le potenzialità dell'utilizzo della tecnica CRISPR-Cas9 per editare i genomi fungini al fine di ottenere ceppi più efficaci da utilizzare come agenti di lotta biologica nei confronti di funghi agenti causali di malattie nelle piante.

ABSTRACT

Fungal pathogens are the main causal agents of almost one third of the diseases worldwide affecting plants, leading to significant reduction in yield and crop quality and causing

enormous economic losses. Biological control includes the use of non-pathogenic microbial antagonists or products derived from their metabolism and represents a valid and promising eco-friendly alternative to chemical pesticides to manage plant diseases. In this paper, the potentiality of the use of the CRISPR-Cas9 technique to edit the genome of fungi to obtain improved strains better performing as biocontrol agents against fungal plant pathogens will be discussed.

BIBLIOGRAFIA

- KNOTT G.J. AND DOUDNA J.A. (2018): *CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering*, «Science», 361(6405), pp. 866-869.
- MAURO A., GARCIA-CELA E., PIETRI A., COTTY P., BATTILANI P. (2018): *Biological control products for aflatoxin prevention in Italy: commercial field evaluation of atoxigenic Aspergillus flavus active ingredients*, «Toxins», 10 (1), pp. 30.
- SARROCCO S., MATARESE F., BARONCELLI R., SEIDL-SEIBOTH V., KUBICEK C.P., VANNACCI G., ET AL. (2017): *The constitutive endopolygalacturonase TvPG2 regulates the induction of plant systemic resistance by Trichoderma virens*, «Phytopathology», 107 (5), pp. 537-544.
- VICENTE MUÑOZ I., SARROCCO S., Malfatti L., BARONCELLI R., VANNACCI G. (2019): *CRISPR-Cas for Fungal Genome Editing: A New Tool for the Management of Plant Diseases*, «Frontiers Plant Science», 10:135. doi: 10.3389/fpls.2019.00135.

Dagli albori della genetica degli insetti alle nuove sfide biotecnologiche per combattere quelli dannosi e invasivi, ovvero “Sex, flies and Cas9-gene drives”

INTRODUZIONE

La nascita dell'agricoltura risolse l'importante problema di conciliare la nuova vita sedentaria della nostra specie con la disponibilità di alimenti, ma apriva un nuovo fronte di lotta per la sopravvivenza: la lotta contro gli insetti che danneggiavano il raccolto. A inizio del secolo scorso, l'evoluzione della Genetica ha visto la scoperta del ruolo dei cromosomi nello sviluppo (determinazione del sesso) e la localizzazione dei geni sui medesimi grazie allo studio di insetti dannosi (*Tenebrio melitor*) o innocui (*Drosophila melanogaster*). La genetica della *Drosophila*, fondata da Thomas Hunt Morgan (1866-1945; Columbia University, USA; Nobel 1933) ha permesso successivamente e senza volerlo di porre le basi per la SIT e la biotecnologia degli insetti dannosi per sviluppare nuovi metodi di controllo.

LO SVILUPPO DELLA TECNICA DELL'INSETTO STERILE, SIT

A metà del secolo scorso, il genetista sovietico Aleksandr Sergeevich Serebrovskii (1892-1948) propose un metodo di controllo di insetti dannosi basato sul rilascio di individui sterilizzati mediante irradiazione perché portatori di nuove mutazioni cromosomiche dominanti letali nei loro gameti. L'idea era derivata anche dagli studi dell'allievo di Morgan, Hermann J. Muller (1890-1967; Nobel nel 1946), che aveva scoperto come i raggi X inducessero mutazioni letali ereditarie nella *Drosophila*. Muller era in visita scientifica in Russia

* Dipartimento di Biologia, Università di Napoli Federico II

proprio nel laboratorio di Serebrovskii. Dopo alcuni decenni l'idea fu messa in pratica negli Stati Uniti da Edward Knippling (1909-2000) che riuscì a eradicare in 4 decadi nell'intera nazione e in quelle limitrofe a sud fino all'istmo di Panama, un insetto dannoso al bestiame, lo "screwworm", o verme trapanatore, *Cochliomyia hominivorax*, le cui larve si nutrono crescendo nelle ferite degli animali. Fu possibile applicare questa tecnica genetica di controllo a questa specie, anche perché era stata sviluppata una dieta artificiale e un metodo di allevamento massivo (Klqssen and Curtis, 2005). Questa tecnica detta dell'insetto sterile, o SIT, fu esportata anche ad altre specie dannose, che sono allevabili in laboratorio e su vasta scala, ma che danneggiano l'agricoltura. Le mosche della frutta appartenenti alla famiglia delle mosche Tephritidae sono il principale bersaglio per proteggere l'agricoltura e la economia. A fine anni Ottanta, sulla base degli avvenuti grandi avanzamenti nella genetica della *Drosophila* fu proposta la nuova strada della biotecnologia per combattere in modo più efficace gli insetti dannosi e potenziare la SIT (Louis et al., 1988). In *Drosophila* erano state infatti sviluppate tecniche di mutagenesi e di isolamento molecolare di geni della determinazione del sesso corrispondenti a ceppi mutanti nel fenotipo. Inoltre era stata applicata con successo la trasformazione genetica mediante elementi trasponibili – curando mosche con occhio bianco, ripristinandone il colore rosso e la piena funzionalità visiva anche con luce intensa.

Dopo l'arrivo della mosca mediterranea *Ceratitis capitata*, detta *medfly*, in California e Florida, ci furono forti contestazioni delle popolazioni urbane contro l'uso del *malathion*, pesticida che veniva spruzzato dall'alto con aerei, anche in zone abitate. Fu quindi inizio un progetto di controllo della *medfly*, ancora oggi attivo, basato sulla SIT.

LO SVILUPPO DI CEPPI MUTANTI DI «CERATITIS» PER SELEZIONARE I SOLI MASCHI

Tre decenni fa, studi di mutagenesi di indotte con radiazioni (presso il laboratorio FAO-IAEA a Seibersdorf, Austria) hanno portato a isolare varie mutazioni geniche. Tra esse, due sono risultate molto utili per separare i maschi dalle femmine in modo semplice e a stadi di sviluppo precoci: 1) un ceppo con mutazione temperatura-sensibile letale embrionale e recessiva (*ts^l/ts^l*) e 2) un ceppo con pupae color bianco (*wp/wp*) invece che marrone. Anche con un pizzico di fortuna (la cosiddetta "serendipity"), è stato selezionato un ceppo eterozigote, con ulteriori riarrangiamenti e che porta una traslocazione, sul

cromosoma Y, di un segmento autosomico contenente i due geni selvatici *tsl*⁺ e *wp*⁺ e sull'autosoma integro, gli alleli recessivi mutanti *tsl* e *wp*. In questo ceppo, è possibile uccidere a stadi embrionali i soli individui XX; *tsl/tsl*, *wp/wp* future femmine, dopo shock a calore per alcune ore a 42°C. È quindi possibile portare avanti nello sviluppo i soli futuri maschi X/Y-*tsl*⁺*wp*⁺ che potranno sopravvivere allo shock e anche mostrare il colore marrone della pupa invece che bianco (come secondo sistema di separazione dei sessi e *check point* della qualità del *sexing*). È importante evitare il rilascio di femmine insieme ai maschi, sebbene entrambi sterilizzati, perché le femmine comunque danneggiano la frutta con l'ovopositore. Sono stati condotti senza successo tentativi di replicare questo metodo di "sexing" dei maschi in altre specie di Tephritidae per le quali è auspicabile applicare la SIT. La biotecnologia potrebbe risolvere questo problema (Saccone, 2018).

I GENI DELLA DETERMINAZIONE DEL SESSO DELLE MOSCHE TEPHRITIDAE

Negli ultimi due decenni in *Ceratitis* è stato sviluppato un armamentario genetico per strategie e per ingegneria genetica che ha permesso di isolare e manipolare geni della determinazione del sesso, di definire l'intero genoma, di sviluppare ceppi transgenici che esprimono nelle sole femmine proteine letali condizionali (Fu et al., 2008), di indurre trasformazione sessuale delle femmine in maschi XX fertili (Saccone, 2018), e di recente anche di trasformare i maschi in femmine XY fertili (Meccariello et al., 2019).

In *Ceratitis* è stato scoperto un gene master per la determinazione del sesso femminile che ha funzioni aggiuntive epigenetiche rispetto al gene ortologo di *Drosophila* (da cui si è partiti per isolarlo), il gene *Cctransformer* (*Cctra*) (Saccone, 2018). *Cctra* è utile anche come risorsa di sequenze regolative, per esprimere con transgeni, nelle sole femmine, proteine letali condizionali (Fu et al., 2007). È utile anche per trasformare le femmine in maschi XX, quando *Cctra* viene spento per alcune ore durante l'embriogenesi con iniezioni di RNA a doppio filamento, e produrre progenie di soli maschi. Ortologi di *Cctra* sono stati isolati in tante altre specie di Tephritidae dei generi *Bactrocera* e *Anastrepha*, confermandone il ruolo chiave e la utilità in campo biotecnologico (Saccone, 2018). Di recente è stato identificato in *Ceratitis*, anche il gene master della determinazione del sesso maschile, il gene *MoY* (*Maleness-on-the-Y*) (Meccariello et al., 2019). *MoY* è in grado di reprimere il master della determinazione del sesso femminile *Cctra* negli embrioni XY, e indurre lo sviluppo maschile. È stato sorprendente e interessante scoprire che *MoY* è fun-

zionalmente conservato nella mosca dell'olivo *Bactrocera oleae* e nella mosca orientale *Bactrocera dorsalis*, una specie invasiva che è stata di recente rilevata per la prima volta in Italia e in Europa (Meccariello et al., 2019). Ortologi di *MoY* sono presenti sul cromosoma Y di altre 5 specie del genere *Bactrocera*, suggerendo una sua vasta conservazione evolutiva, e quindi un suo possibile uso per produrre progenie di solo sesso maschile mediante transgenesi.

L'EDITING GENOMICO IN «CERATITIS» E NELLE ALTRE «TEPHRITIDAE»: STATO DELL'ARTE E POTENZIALI APPLICAZIONI NEL LORO CONTROLLO

Da quando la CRISPR/Cas9 è stata applicata anche in *Drosophila* per mutagenizzare geni, per modificarli o inserire sequenze di DNA esogeno, si sono susseguiti a ritmo incalzante studi simili in altre specie di insetti appartenenti non solo ai Ditteri, ma anche Imenotteri, Lepidotteri e Coleotteri. Abbiamo messo a punto un metodo di applicazione della CRISPR/Cas9 in *Ceratitis capitata*, in *Bactrocera oleae* (Meccariello, A., Tsoumani, K. T., al., dati non pubblicati) e *Musca domestica*, basato sull'uso di proteina Cas9 purificata in laboratorio – per renderla più economica – sulla produzione *in vitro* di sgRNA (che permettono il riconoscimento specifico del gene da colpire, sull'assemblaggio del complesso proteina-RNA (Cas9+gRNA) *in vitro* e della iniezione in embrioni di insetto, appena dopo la ovodeposizione (Saccone, 2018). Simili approcci sono stati sviluppati in varie altre specie delle Tephritidae (*Bactrocera dorsalis*, *Anastrepha*; Saccone, 2018). È possibile indurre in via transiente con alta efficienza mutazioni anche bialleliche (2 alleli su i 2 cromosomi omologhi, in ciascuna cellula) nelle cellule somatiche e germinali degli embrioni, dai quali si sviluppa una progenie parzialmente mutante (mosaico) che quando incrociata, da origine a una successiva progenie che mostra parte degli individui pienamente mutanti (omozigoti). Un'alternativa disponibile già in *Drosophila*, nel baco da seta *Bombyx mori*, e in varie specie di zanzare (*Anopheles* e *Aedes*) è la produzione di ceppi transgenici che esprimono in modo endogeno la proteina Cas9 e il gRNA gene-specifico, necessari per l'evento di gene editing. In questi ceppi transgenici è possibile anche indurre mediante eventi di ricombinazione omologa, una duplicazione della singola copia del transgene presente su un solo cromosoma, sul sito corrispondente del cromosoma omologo. Un insetto che riceve una sola copia del costrutto transgenico, durante il suo sviluppo e nelle sue cellule germinali, lo duplica, divenendo in pratica un omozigote. Si assiste così a una cosiddetta ereditarietà super-mendeliana anche detta *gene drive*, che permette di

trasmettere il costrutto genico artificiale e aumentarne la sua frequenza in poche generazioni in popolazioni che simulano quelle selvatiche. Se il costrutto transgenico *gene drive* viene progettato così da avere anche la caratteristiche di indurre una sterilità femminile o una trasformazione delle femmine in maschi (ad esempio, usando un gene mascolinizzante), dopo poche generazioni si assiste al collasso delle popolazioni bersaglio.

Attualmente la sperimentazione del *gene drive* avviene solo in laboratori che rispettano livelli di sicurezza elevata per evitare la diffusione nell'ambiente di insetti transgenici, ancora prima di capire se e quando si fermerà nell'avanzare in ogni generazioni nelle popolazioni selvatiche e se vi siano rischi ecologici. Queste sperimentazione mirano anche a superare problemi di resistenza al *gene drive* che si presenta dopo poche generazioni e che ne limiterebbe l'efficacia. Combattere specie aliene di insetti dannosi con questo sistema, una volta assenti in specifiche regioni geografiche, potrebbe essere più accettabile per la società in un prossimo futuro, anche dopo che la sperimentazione avrà fornito dati rassicuranti su eventuali rischi. Intanto, sono già anni che in Brasile vengono rilasciate zanzare *Aedes aegypti* transgeniche ma sterili, per combattere la diffusione del virus zika. Il ceppo transgenico permette di separare facilmente i maschi dall'allevamento in biofattoria, risolvendo il problema delle femmine che, seppure sterili comunque farebbero il pasto di sangue, e quindi potenzialmente veicolando il patogeno. Questa sperimentazione in campo in Brasile potrà essere la base per spiegare alla società i benefici dell'uso di insetti OGM e possibilmente far accettare in futuro nuove soluzioni ancora più efficaci come quelle promesse dal *gene drive*.

Una maggiore conoscenza scientifica, una evoluzione nella politica e nella legislazione e attente valutazioni rischi-benefici saranno elementi vitali per rendere possibile una discussione costruttiva verso questa direzione.

RIASSUNTO

Molte specie di insetti sono dannose alla produzione agricola o alla salute umana e il cambiamento climatico amplifica il problema permettendo a quelle invasive di spostarsi e colonizzare nuovi territori. Un metodo di controllo alternativo all'uso dei pesticidi chimici, basato sulla genetica e specie-specifico è la tecnica dell'insetto sterile (SIT), che consiste nel continuo rilascio di maschi sterili nelle zone infestate. In questo contributo verranno descritte le tappe storiche della genetica di insetti dannosi, l'identificazione di loro geni della determinazione del sesso e verranno analizzate le potenzialità del loro utilizzo biotecnologico a fini del loro controllo, combinate con la tecnica CRISPR-Cas9.

ABSTRACT

Many insect species are harmful to agriculture or human health and the climate change empowers the problem, allowing those invasive ones to migrate and colonize new geographic areas. A control method, alternative to chemical pesticides, based on genetics and species-specific is the sterile insect technique (SIT), which consists in a continuous release of sterile males in the infested regions. In this essay, we will describe historical steps that led to the genetics of pest insects and to the identification of their sex determining genes. Furthermore, we will analyze the possibilities of their biotechnological use to their control, in the frame of CRISPR-Cas9.

REFERENZE

- FU G., CONDON K.C., EPTON M.J., GONG P., JIN L., CONDON G.C., MORRISON N.I., DAFALLA T.H., ALPHEY L. (2007): *Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing*, «Nat Biotechnol.», Mar, 25 (3), pp. 353-357. Epub Feb 18.
- KLASSEN W. AND CURTIS C.F. (2005): *History of the Sterile Insect Technique*, in *Sterile Insect Technique, Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*, Dyck V.A., Hendrichs J., Robinson A.S. (Eds.), Springer, pp. 3-36, ISBN 978-1-4020-4051-1.
- LOUIS C., SAVAKIS C., KAFATOS F.C. (1988): *Possibilities for genetic engineering in insects of economic interest*, in *Modern Insect Control: Nuclear Techniques and Biotechnology*, International Atomic Energy Agency, ISBN 92-0-010388-X.
- MECCARIELLO A., SALVEMINI M., PRIMO P., HALL B., KOSKINIOTI P., DALÍKOVÁ M., GRAVINA A., GUCCIARDINO M.A., FORLENZA F., GREGORIOU M.E., IPPOLITO D., MONTI S.M., PETRELLA V., PERROTTA M.M., SCHMEING S., RUGGIERO A., SCOLARI F., GIORDANO E., TSOUMANI K.T., MAREC F., WINDBICHLER N., NAGARAJU J., ARUNKUMAR K., BOURTZIS K., MATHIOPOULOS K.D., RAGOISSIS J., VITAGLIANO L., TU Z., PAPATHANOS P.A., ROBINSON M.D. AND SACCONI G. (2019): *Maleness-on-the-Y (MoY) orchestrates male sex determination in major agricultural fruit fly pests*, bioRxiv 533646; doi: <https://doi.org/10.1101/533646>
- SACCONI G. (2018): *Sex Determination and Gene Editing in Tephritids: Converging on Innovative Biocontrol Strategie*, «Atti Accademia Nazionale. Italiana di Entomologia», LXVI.

CLAUDIO MOSER*, LORENZA DALLA COSTA*, LISA GIACOMELLI*,
ELENA BARALDI**, MICKAEL MALNOY*

Editing genomico in piante da frutto per la difesa dalle principali malattie

La difesa delle piante da frutto dalle malattie con le sue implicazioni economiche, quali la perdita della produzione e il costo dei programmi di difesa, e le implicazioni socio-ambientali, legate agli impatti negativi della distribuzione di fitofarmaci sulla salute della popolazione e dell'ambiente, è stata da sempre oggetto di numerose ricerche. Le strategie di difesa più recenti, tese a ridurre l'impiego di prodotti di sintesi chimica, prevedono l'uso di sistemi di supporto alle decisioni (es. modelli epidemiologici e dati meteorologici) per rendere più efficaci i trattamenti, l'uso di prodotti di origine biologica (es. agenti di biocontrollo di origine fungina e batterica, peptidi, ecc.) e l'uso di varietà resistenti alle principali malattie. Di solito le varietà resistenti sono ottenute con programmi di miglioramento genetico che incrociano un genitore donatore di resistenza con un genitore portatore di caratteristiche di elevata qualità del frutto ma anche agronomiche. Le piante arboree da frutto fra le quali vite e melo, hanno delle caratteristiche in comune che rendono l'attività di miglioramento genetico particolarmente lunga e peculiare: i) la lunga fase giovanile del semenzale di almeno due tre anni, ii) l'elevata eterozigosità dell'assetto genetico trattandosi di specie allogame, iii) la possibilità di propagazione vegetativa (agamica) che consente la moltiplicazione all'infinito dello stesso materiale (clone), iv) un tempo prolungato di durata dell'impianto (vigneto o meleto) variabile fra i 15 e i 30 anni (investimento di lungo termine e importante effetto ambientale).

I primi materiali commerciali che presentano una buona qualità del frutto e resistenti alle maggiori patologie fungine di vite (oidio e peronospora) e

* Centro Ricerca&Innovazione, Fondazione Edmund Mach (FEM), San Michele all'Adige (TN)

** Laboratorio di Biotecnologie vegetali, Università di Bologna

melo (ticchiolatura) ottenuti tramite breeding sono disponibili da qualche anno e la loro diffusione pur essendo ancora molto limitata, cresce di anno in anno, dimostrando un notevole interesse per questi nuovi materiali.

La recente possibilità di editare il genoma grazie all'applicazione della tecnologia CRISPR/Cas e della cis-genesi, ha suscitato grande interesse e apre nuove prospettive di sviluppo nel miglioramento genetico vegetale. I vantaggi di queste Nuove Tecnologie di Breeding (NTB) rispetto al breeding tradizionale sono sostanzialmente di due tipi: i) una riduzione dei tempi per ottenere le varietà migliorate in quanto non sono richiesti reincroci, ii) l'ottenimento di varietà con un assetto genetico essenzialmente uguale al materiale cui è stata applicata la NTB e quindi probabilmente di un clone e non di una nuova varietà. Il CRISPR/Cas, nella sua applicazione più semplice, permette infatti di introdurre mutazioni puntiformi o piccole inserzioni e delezioni nel genoma della pianta in una posizione precisa. Queste variazioni possono alterare o inattivare la proteina codificata con la conseguente perdita della sua funzione. Con la cis-genesi viene invece introdotta una nuova funzione mediante il trasferimento di un gene appartenente a una specie sessualmente compatibile. In entrambi i casi i prodotti ottenuti con le NTB sono assimilabili a quelli ottenibili attraverso incrocio e selezione e per questo motivo dovrebbero essere più accettati anche dal consumatore.

Presso la Fondazione Edmund Mach (FEM) da qualche anno gli autori di questa relazione stanno utilizzando genome editing e cis-genesi per ottenere viti resistenti a peronospora e oidio e meli resistenti a oidio, ticchiolatura e colpo di fuoco batterico. Sono gli stessi approcci utilizzati dalla prof.ssa Baraldi e dai suoi collaboratori all'Università di Bologna per ottenere piante di fragole resistenti alla muffa grigia e all'antracnosi causate dai funghi *Botrytis cinerea* e *Colletotrichum spp.*

Per la vite la strategia utilizzata è quella di inattivare due piccole famiglie geniche, quella dei geni *MLO* (Mildew locus O) e quella dei geni DMR 6 (Downy mildew resistance 6), che possono essere classificati come geni di suscettibilità in quanto sono essenziali affinché il patogeno riconosca la pianta come ospite e inizi il processo di infezione. I geni *MLO* sono stati caratterizzati per la prima volta in orzo (Buschges et al., 1997) dimostrando che codificano per delle proteine integrali di membrana e che l'allele nullo conferisce resistenza alla pianta contro il mal bianco causato da *Blumeria graminis*. Un effetto simile della mutazione nei geni *MLO* è stato poi riportato per *Arabidopsis*, pomodoro, grano e riso e più recentemente dal gruppo del dr. M. Malnoy alla FEM in vite e melo mediante RNA interference (Pessina et al., 2014 e 2016). In vite sono stati individuati 17 geni *MLO*, ma sono

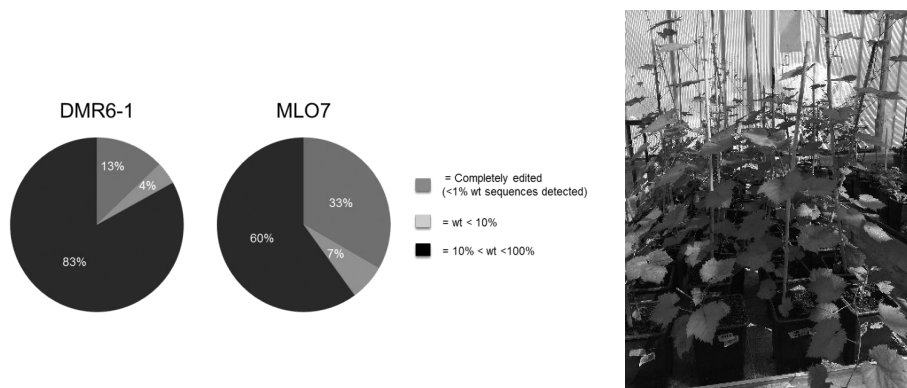


Fig. 1 *Sommario del numero di piante di vite editate nei geni DMR6-1 e MLO7 in base all'entità di editing riscontrato tramite sequenziamento a elevata copertura della regione target. Nell'insero di destra sono visibili alcune delle piante cresciute in serra*

Fig. 1 *Summary of the number of grapevine plants edited in the DMR6-1 and MLO7 genes according to the extent of editing measured through high-coverage sequencing of the target region. Some of the edited plants grown in the greenhouse are depicted in the right hand side picture*

3 quelli maggiormente coinvolti nel processo infettivo dell'agente causale dell'oidio. I geni *DMR6* sono stati scoperti in *Arabidopsis* mediante uno screening di sensibilità a *Hyaloperonospora arabidopsidis* in una collezione di mutanti ottenuti tramite mutagenesi chimica (Zeilmaker et al., 2014). Nel genoma di vite abbiamo identificato 2 geni *DMR6* che abbiamo provato essere gli ortologhi dei geni *DMR6* di *Arabidopsis* tramite complementazione del mutante *dmr6*.

Attraverso la trasformazione di callo embrionico di vite mediante *Agrobacterio* e impiegando un costrutto che codifica per la nucleasi Cas 9 e l'RNA guida disegnato sui geni *MLO* e *DMR6*, siamo riusciti recentemente a ottenere piante completamente editate in uno dei geni target sia per *DMR6* che per *MLO*, come riportato in figura 1.

Per il melo stiamo utilizzando sia la tecnica del genome editing, per inattivare i geni *MLO* di melo e altri geni di suscettibilità probabilmente coinvolti nel colpo di fuoco batterico causato da *Erwinia amylovora*, sia la tecnica della cis-genesi per introdurre geni di resistenza alla ticchiolatura causata dal fungo *Venturia inaequalis* trasferendo geni di resistenza da altre specie cross fertili con *Malus domestica* quali ad esempio *Malus floribunda* (gene Vf).

Per minimizzare l'introduzione di DNA esogeno nella pianta trasformata, una strategia che stiamo utilizzando e che si sta rivelando efficace sia in vite

che in melo (dati non ancora pubblicati) è quella che prevede la presenza di siti di ricombinazione riconosciuti dalla ricombinasi FLP agli estremi della cassetta di T-DNA e la possibilità di indurre tramite shock termico l'espressione della ricombinasi FLP. Questo sistema può permettere di eliminare il T-DNA (generalmente una regione di oltre 10 Kb) lasciando una traccia di DNA esogeno inferiore ai 60 nucleotidi.

In fragola la strategia adottata dalla prof.ssa Baraldi è quella di validare alcuni geni di interesse tramite una loro espressione transiente e successivamente sovraesprimere o silenziare attraverso trasformazione stabile rispettivamente un gene di resistenza e due geni di suscettibilità.

RIASSUNTO

Le Nuove Tecnologie di Breeding (NBT) rappresentano una opportunità molto interessante per ottenere varietà resistenti alle principali malattie. Esse infatti consentirebbero di produrre piante resistenti in tempi più brevi rispetto al breeding convenzionale e con un assetto genetico quasi uguale a quello del materiale vegetale da cui derivano. Presso la Fondazione Edmund Mach da qualche anno stiamo applicando genome editing e cis-genesi per ottenere viti resistenti a peronospora e oidio e meli resistenti a oidio, ticchiolatura e colpo di fuoco batterico. Un approccio simile è utilizzato all'Università di Bologna per ottenere fragole resistenti alla muffa grigia e all'antracnosi. Nel caso del genome editing l'obiettivo è quello di inattivare geni di suscettibilità, essenziali per il patogeno per poter infettare il tessuto ospite mentre nel caso della cis-genesi si introducono geni di resistenza provenienti da specie cross-fertili con la specie di interesse. Le prime piantine di vite e melo ottenute con le NBT sono ora disponibili in serra e a breve verranno testate con infezioni artificiali per valutarne la resistenza alle malattie e i parametri di crescita.

ABSTRACT

The New Breeding Technologies (NBT) represent a very interesting opportunity to obtain new disease-resistant varieties. They promise to produce resistant plants in a shorter time compared to conventional breeding and with a genetic makeup pretty much equivalent to that of the plant from which they derive. At the Fondazione Edmund Mach we have been applying genome editing and cis-genesis to obtain vines resistant to downy mildew and powdery mildew and apple trees resistant to powdery mildew, scab and fire blight. A similar approach is used at the University of Bologna to obtain strawberries resistant to gray mold and anthracnose. In the case of genome editing, the goal is to inactivate susceptibility genes, which are essential for the pathogen to infect the host tissue, while in the case of cis-genesis, resistance genes from cross-fertile species are introduced within the species of interest. The first grapevine and apple plantlets obtained by NBT are now available in the greenhouse and will soon be tested with artificial infections to assess their resistance to diseases and growth parameters.

BIBLIOGRAFIA

- BUSCHGES R., HOLLRICHER K., PANSTRUGA R. (1997): *The barley mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance*, «Cell», LXXXVIII, 5, pp. 695-705.
- PESSINA S., PAVAN S., CATALANO D., GALLOTTA A., VISSER R.G.F., BAI Y., MALNOY M.A., SCHOUTEN H.J. (2014): *Characterization of the MLO gene family in Rosaceae and gene expression analysis in Malus domestica*, «BMC GENOMICS», 15 (618), pp. 1-12.
- PESSINA S., LENZI L., PERAZZOLLI M., CAMPA M., DALLA COSTA L., URSO S., VALE G., SALAMINI F., VELASCO R., MALNOY M.A. (2016): *Knockdown of MLO genes reduces susceptibility to powdery mildew in grapevine*, «Horticulture Research», 3 (16016), pp. 1-9.
- ZEILMAKER T., LUDWIG N. R., ELBERSE J., SEIDL M.F., BERKE L., VAN DOORN A., SCHUURINK R. C., SNEL B., VAN DEN ACKERVEKEN G. (2015): *DOWNY MILDEW RESISTANT 6 and DMR6-LIKE OXYGENASE 1 are partially redundant but distinct suppressors of immunity in Arabidopsis*, «Plant Journal», LXXXI, 2, pp. 210-222.

Quale disciplina per l'editing genomico in agricoltura?

1. Dopo la sentenza della Corte di Giustizia del 25 luglio 2018 in causa C-528/16 e in presenza di una importante evoluzione delle tecniche di miglioramento genetico applicabili alle specie agrarie – si parla di New Breeding Techniques e/o di Precision Breeding, ma anche di Biotecnologie sostenibili¹ – ci si interroga sulla opportunità di intervenire sul tessuto normativo europeo che appare inadeguato a rispondere alle esigenze di ammodernamento dell'agricoltura nella dimensione dello sviluppo sostenibile. Sono oggetto di discussione principalmente le regole sull'introduzione nel mercato degli organismi geneticamente modificati, con particolare riferimento all'individuazione dell'ambito di applicazione come definito dalla dir. 2001/18/CE. Dopo un'illustrazione delle questioni poste all'attenzione dei giudici di Lussemburgo e un breve esame della pronuncia saranno riassunti i termini del dibattito che si è originato e le prospettive per la regolazione dell'editing genomico in agricoltura.

2. Le questioni pregiudiziali decise con la sentenza in discorso originano dalla controversia giunta – a valle di un'annosa battaglia contro i cd “ogm cachés” condotta nelle campagne francesi, anche con le modalità violente dei “faucheurs volontaires”² – davanti al Conseil d'Etat a seguito del ricorso della

* *Università di Pisa*

¹ Nel novembre del 2016 l'allora ministro dell'Agricoltura Martina annunciava il varo di un Piano per lo sviluppo delle Biotecnologie sostenibili e l'assegnazione al CREA di fondi per portare avanti la ricerca pubblica.

² Il movimento dei fauchers volontaires, costituito ufficialmente nel 2003 dopo una pratica di distruzione di campi sperimentali OGM iniziata alla fine degli anni '90, ha iniziato a occuparsi dei cd ogm cachés dal 2009 con la distruzione di quelle che chiamano VrTH (variétés rendues

Confederation Paysanne e di altre otto organizzazioni francesi, volto a: ottenere l'annullamento della decisione di rigetto della richiesta di abrogazione dell'art. 531-2 Code de l'environnement³ e di divieto della coltivazione e commercializzazione di varietà di colza tolleranti agli erbicidi; ingiungere al primo ministro l'instaurazione di una moratoria su quelle varietà. Al termine di un esame delle posizioni delle parti – che ha visto contrapposto l'argomento secondo il quale le varietà resistenti agli erbicidi ottenute con mutagenesi presentano gli stessi rischi per l'ambiente naturale e agrario e per la salute umana e animale delle varietà transgeniche con il medesimo carattere di resistenza, a quello, sostenuto dal Ministro dell'agricoltura, secondo il quale i rischi deriverebbero non tanto dalle proprietà delle piante bensì dalle modalità di coltivazione adottate dagli agricoltori – e della presa d'atto dello sviluppo di nuove tecniche di mutagenesi sito diretta, i giudici francesi hanno ritenuto necessario sottoporre alla Corte di Giustizia alcune questioni pregiudiziali:

1) Se gli organismi ottenuti per mutagenesi costituiscano [OGM] ai sensi dell'articolo 2 della direttiva 2001/18, benché siano esentati in forza dell'articolo 3, e dell'allegato I B, d[i tale] direttiva dagli obblighi imposti ai fini dell'emissione e dell'immissione sul mercato di [OGM]. In particolare, se le tecniche di mutagenesi, segnatamente le nuove tecniche di mutagenesi sito diretta che applicano processi d'ingegneria genetica, possano considerarsi annoverate tra le tecniche elencate nell'allegato I A, cui rinvia l'articolo 2.

Di conseguenza, se gli articoli 2 e 3, e gli allegati I A e I B, della direttiva [2001/18] debbano essere interpretati nel senso che esentano dalle misure precauzionali, di valutazione del rischio e di tracciabilità tutti gli organismi e le sementi geneticamente modificati ottenuti per mutagenesi, o soltanto gli organismi ottenuti con i metodi tradizionali di mutagenesi casuale mediante radiazioni ionizzanti o esposizione ad agenti chimici mutageni esistenti precedentemente all'adozione di tali norme.

2) Se le varietà ottenute per mutagenesi costituiscano varietà geneticamente modificate ai sensi dell'articolo 4 della direttiva [2002/53], che non sarebbero esentate dagli obblighi previsti da tale direttiva.

tolérantes à un herbicide), ottenute con tecniche di mutagenesi "in vitro": parcelle sperimentali di varietà di girasole, colture di colza. Per una informazione diretta vedi <https://www.faucheurs-volontaires.fr/index.php>

³ Article L531-2 Ne sont pas soumis aux dispositions du présent titre et des articles L. 125-3 et L. 515-13 les organismes génétiquement modifiés obtenus par des techniques qui ne sont pas considérées, de par leur caractère naturel, comme entraînant une modification génétique ou par celles qui ont fait l'objet d'une utilisation traditionnelle sans inconvénient avéré pour la santé publique ou l'environnement. La liste de ces techniques est fixée par décret après avis du Haut Conseil des biotechnologies.

Ovvero se, al contrario, l'ambito di applicazione della direttiva in parola sia identico a quello [degli] articoli 2 e 3, e dell'allegato I B, della direttiva [2001/18] e comporti parimenti la deroga delle varietà ottenute per mutagenesi dagli obblighi previsti dalla direttiva [2002/53] ai fini dell'iscrizione di varietà geneticamente modificate nel catalogo comune delle specie di piante agricole.

3) Se gli articoli 2 e 3, e l'allegato I B, della direttiva [2001/18] sull'emissione deliberata nell'ambiente di [OGM], poiché escludono la mutagenesi dall'ambito di applicazione degli obblighi previsti da [tale] direttiva, costituiscono una misura di armonizzazione completa, che vieta agli Stati membri di assoggettare gli organismi ottenuti per mutagenesi al rispetto totale o parziale degli obblighi previsti da [tale] direttiva o a qualsivoglia altro obbligo, o se gli Stati membri dispongano, in sede di trasposizione di tali articoli, di un margine di discrezionalità rispetto alla definizione del regime applicabile agli organismi ottenuti per mutagenesi.

4) Se la validità degli articoli 2 e 3, e degli allegati I A e I B, della direttiva [2001/18] rispetto al principio di precauzione garantito dall'articolo [191, paragrafo 2], TFUE, in quanto tali disposizioni non assoggetterebbero gli [OGM] ottenuti per mutagenesi a misure precauzionali, di valutazione del rischio e di tracciabilità, possa essere messa in discussione tenendo conto dell'evoluzione dei processi dell'ingegneria genetica, della comparsa di nuove varietà di piante ottenute grazie a tali tecniche e delle attuali incertezze scientifiche sul loro impatto e sui potenziali rischi che possono derivarne per l'ambiente e la salute umana e animale.

3. Gli argomenti dibattuti con riferimento alla prima questione si appuntano dapprima sul dato testuale (art. 2, par. 2 lett. a) («un organismo (...) il cui materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura») per affermare: che gli organismi ottenuti mediante tecniche o metodi di mutagenesi devono essere considerati come OGM; che l'espressione «tra l'altro» inclusa nel primo periodo della parte 1 dell'allegato I A alla direttiva 2001/18 («le tecniche di modificazione genetica di cui all'art. 2, par. 2 lett. a), comprendono *tra l'altro*») fa ritenere che l'elenco delle tecniche di modificazione genetica contenute in tale parte non sia tassativo, e che quindi sia possibile ricomprendere tecniche di modificazione genetica ulteriori rispetto a quelle ivi esplicitamente elencate; che il legislatore dell'Unione europea non ha incluso la mutagenesi nell'elenco tassativo delle tecniche che *non* comportano modificazioni genetiche, di cui all'articolo 2, punto 2, lettera b), della

direttiva 2001/18, in combinato disposto con la parte 2 dell'allegato I A a quest'ultima.

Il dato testuale viene posto in secondo piano quando si giunge a considerare l'allegato IB richiamato dall'art. 3, par. 1 («La presente direttiva non si applica agli organismi ottenuti con le tecniche di modificazione genetica di cui all'allegato IB») laddove la mutagenesi è espressamente citata tra le tecniche e i metodi di «modificazione genetica» che devono essere esclusi dall'ambito di applicazione di quest'ultima: in questo caso opererebbe il principio dell'interpretazione restrittiva delle norme di eccezione, anche in ragione della generalità del riferimento legislativo a una tecnica comprensiva di svariati metodi e per la quale il legislatore non ha ritenuto di dover fornire una definizione giuridica. Supporterebbe questo indirizzo interpretativo relativamente alla portata della deroga la lettera del considerando 17 della direttiva stessa secondo il quale la direttiva 2001/18 «non concerne gli organismi ottenuti attraverso determinate tecniche di modificazione genetica utilizzate convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza». Una conclusione che si reputa coerente con l'obiettivo stesso della citata direttiva che mira alla protezione della salute umana e dell'ambiente «nel rispetto del principio precauzionale» e che contrasterebbe con una interpretazione ampia della deroga ex art. 3.

Quanto alla seconda domanda pregiudiziale, giustificata dal mancato richiamo dell'art. 3, par. 1 della dir. 2001/18 da parte dell'art. 4 par. 4 della dir. 2002/53 che definisce le «varietà geneticamente modificate», la Corte considera che sarebbe incoerente imporre per le varietà geneticamente modificate obblighi, in materia di valutazione dei rischi per la salute e per l'ambiente, dai quali la direttiva 2001/18 le esenta esplicitamente, quindi si esprime per una lettura che escluda dall'ambito di applicazione della dir. 2002/53 le varietà ottenute con i metodi di mutagenesi «utilizzati convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza».

Sulla terza questione la Corte conclude che l'esclusione della mutagenesi «tradizionale» dall'applicazione della disciplina della dir. 2001/18 non impedisce ai singoli Stati membri di sottoporre quei metodi a obblighi di sicurezza specifici o anche a quelli previsti dalla direttiva sugli OGM, nel rispetto del diritto dell'Unione «in particolare delle norme relative alla libera circolazione delle merci».

Non si pronunciano i giudici di Lussemburgo sulla quarta questione che ritengono risolta in considerazione della risposta al primo quesito.

4. A seguito della pronuncia si è innescato un dibattito intorno alle conseguenze sullo sviluppo delle tecniche di genome editing in agricoltura e sono

stati avanzati rilievi critici sul percorso interpretativo e sulla decisione: una decisione che, peraltro, si è discostata dalla posizione assunta dall'avvocato generale Bobek nelle conclusioni (presentate il 18 gennaio 2018), segnatamente con riferimento all'interpretazione della deroga relativamente alla mutagenesi ex art. 3, par. 1 della dir. 2001/18. Bobek difatti aveva anzitutto rigettato le considerazioni di ordine "temporale" volte a interpretare la volontà del legislatore sulla base delle tecniche esistenti al momento della elaborazione della normativa (quella del 1990 e quella del 2001) e suggerito alla Corte di ritenere come unico criterio di distinzione possibile quello, indicato dalla direttiva, dell'«impiego di molecole di acido nucleico ricombinante o di (OGM) diversi da quelli prodotti mediante mutagenesi o fusione cellulare di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali»; degna di nota anche la diversa valutazione circa il ruolo del considerando 17 che non menziona la mutagenesi tra le tecniche di «modificazione genetica utilizzate convenzionalmente in varie applicazioni con una lunga tradizione di sicurezza» e che, stando ai lavori preparatori della prima direttiva del 1990 (1990/220), è stato inserito prima che venisse persino discussa l'introduzione della norma relativa alla deroga.

Nella messe dei commenti all'indomani della pronuncia della Corte di giustizia emergono alcuni rilievi come quello circa l'irragionevolezza di una regolazione – come quella che emergerebbe dalla lettura dei giudici di Lussemburgo – che esenta dalle più severe regole del percorso di autorizzazione le tecniche di mutagenesi più imprecise del passato mentre sottopone a un vaglio, al quale corrispondono alti costi economici e amministrativi, le moderne e più sostenibili tecniche di genome editing, considerate peraltro come un insieme omogeneo e senza che sia possibile operare distinzioni (si pensi alle differenze fra i metodi SSN1, SSN2 e SSN3: Albújar e van der Meulen, 2018); e quello che richiama le difficoltà di individuazione dell'origine di mutazioni genetiche che potrebbero anche essere l'esito di processi naturali, con la conseguenza di fare spazio, tanto più in ragione dell'apertura del mercato ai prodotti di Paesi con una diversa posizione circa la regolazione delle NPBT, a norme inapplicabili e a disuguaglianze fra produttori.

Ritorna, nella discussione sulle nuove tecniche, l'argomento – centrale nel confronto circa la regolazione degli OGM (Sirsi, 2017) –, fatto proprio da ultimo anche dal SAM (Scientific Advice Mechanism)⁴, secondo il quale

⁴ Statement by the Group of Chef Scientific Advisor, *A Scientific Perspective on the Regulatory Status of Products Derived from Gene Editing and the Implications for the GMO Directive*, https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/2018_11_gcsa_statement_gene_editing_2.pdf

occorrerebbe guardare al prodotto piuttosto che al processo, come dimostra la stessa vicenda alla base della controversia, legata al rifiuto di varietà resistenti a erbicidi: un prodotto che può essere realizzato sia con tecniche tradizionali sia con tecniche di modificazione genetica più e meno “moderne”.

5. La necessità di intervenire su una normativa elaborata quasi trenta anni fa; basata sulla netta distinzione fra piante transgeniche⁵ e convenzionali; letta, malgrado la compresenza di riferimenti al prodotto e al processo, come disciplina di processo, emerge con evidenza dalle divergenze fra gli stessi Stati membri registrate negli ultimi anni a seguito delle domande per emissioni sperimentali ricevute con riferimento a piante ottenute con tecniche di genome editing (CIBUS per una colza resistente agli erbicidi ottenuta con RTDS, un tipo di mutagenesi diretta, oligonucleotide-directed mutagenesis, ODM); dalla istituzione, già nel 2007, in seno alla istituzione europea di un gruppo di lavoro che valutasse una lista di tecniche con riferimento all'ambito di applicabilità della dir. 2001/18; dalle numerose Opinion emanate da comitati scientifici e autorità nazionali (Sirsi, 2017; Sprink et al., 2016; Ishii-Araki, 2017). Nel 2017 le autorità olandesi avevano presentato una proposta – *Proposal for discussion on actions to improve the exemption mechanism under Directive 2001/18/EC* 1 September 2017 – di revisione in chiave di proporzionalità dell'intervento normativo. Nel documento olandese, a una lista di osservazioni e suggerimenti – circa la lunghezza e i costi delle procedure autorizzatorie che limitano l'accesso all'innovazione tecnologica delle piccole e medie imprese; la inadeguatezza della regolazione di processo ad aumentare la biosicurezza; la mancanza di chiarezza e di certezza legale da cui deriva disarmonia quando si applichi la direttiva a prodotti risultanti dall'uso di NPBTs; la necessità che l'intervento vada nella direzione del miglioramento del mercato interno, assicurando nello stesso tempo la sicurezza per la salute umana e per l'ambiente – è seguita la proposta di un confronto fra le autorità europee sulla applicabilità della direttiva 2001/18 alle NPBTs, in considerazione del fatto che le piante che ne risultano sono sicure (sane) come quelle ottenute con tecniche tradizionali di *breeding*. In particolare, la proposta va nella direzione di un intervento sull'Allegato IB, mai sottoposto allo scrutinio legato al progresso tecnico, riconsiderando il meccanismo di esenzione.

Secondo quanto dichiarato dal Scientific Advice Mechanism nel novem-

⁵ La direttiva non usa mai il termine “transgenico”, che compare esclusivamente nella regolazione della coesistenza fra colture, ma è stata costruita con riferimento a quel metodo sulle cui caratteristiche si è sviluppato il dibattito mondiale sugli OGM.

bre del 2018 alla luce della pronuncia della Corte di giustizia, l'attuale regolazione delle biotecnologie ha dimostrato di non essere più adeguata alle nuove conoscenze scientifiche e ai più recenti sviluppi tecnologici e "should be reviewed so as to identify the feasibility of improving the consistency and efficiency of that framework". La revisione dovrebbe contemplare la ridefinizione di OGM tenendo conto della realtà delle mutazioni naturali, dell'istanza di sicurezza e delle possibilità tecniche di individuazione, identificazione e quantificazione, e non dovrebbe ignorare i tempi e i costi dei procedimenti autorizzatori tenendo conto dell'interesse delle piccole e medie imprese.

RIASSUNTO

Le incertezze intorno allo status giuridico-normativo delle NBT hanno condotto al confronto circa l'applicabilità della normativa europea sugli OGM, questione sulla quale si è espressa la Corte di Giustizia con la sentenza del 25 luglio 2018 in causa C-528/16. La Corte ha concluso che: a) gli organismi ottenuti con tecniche di mutagenesi sono da considerare OGM ai sensi della dir. 2001/18/CE; b) che l'esenzione della mutagenesi prevista dall'Allegato 1B della medesima direttiva si applica esclusivamente agli organismi ottenuti con le tecniche di mutagenesi che hanno una lunga tradizione di sicurezza i quali, c) potrebbero essere comunque oggetto di una normativa nazionale.

La pronuncia non scioglie i dubbi sulla regolazione dell'impiego delle tecnologie in agricoltura emersi nel dibattito sugli OGM – approccio di prodotto/processo, valutazione rischi-benefici/principio di precauzione – né risponde agli interrogativi posti dalle nuove tecniche che permettono di ottenere prodotti del tutto simili a quelli ottenibili con le tecniche tradizionali e per questo da essi indistinguibili. Ne è seguito un dibattito sul bisogno di aggiornamento della legislazione sulle innovazioni tecnologiche nello specifico ambito della genetica applicata al miglioramento varietale.

ABSTRACT

The uncertainty surrounding the legal status of NBT led to the discussion whether these techniques lead to products that are subject to the EU GMO legislation (EU Directive 2001/18/EU on Deliberate Release of Genetically Modified Organisms).

On 25th July 2018, the European Court of Justice (ECJ) delivered its ruling on Case C-528/16 which aims to clarify the legal status of mutagenesis. The judgment found that (a) organisms obtained by mutagenesis techniques are to be considered genetically modified organisms (GMOs) within the meaning of Directive 2001/181 (Directive), and (b) the *express* exemption of mutagenesis in Annex 1B of the Directive applies only to organisms obtained by means of techniques of mutagenesis which have conventionally been used in a number of applications and have a long safety record, which may, however, be the subject of national legislation.

The pronouncement doesn't unravel the tangles of the regulation of the technologies

in agriculture emerged in the debate on the OGMs – product/process approach, risk-benefit assessment/precautionary principle – neither answers to the questions set by the new techniques that allow to get products in everything similar to those obtainable with the traditional techniques and from them indistinguishable.

A debate followed on the need to update the legislation of technological innovation in the specific field of genetic applied to varietal improvement .

BIBLIOGRAFIA

- ALBÚJAR G.F., VAN DER MEULEN B. (2018): *The EU's GMO concept: analysis of the GMO Definition in EU law in the light of New Breeding Techniques (NBTs)*, «EFFL», 1, pp. 14-28.
- ISHII T., ARAKI M. (2017): *A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome –edited crops*, «GM Crops & Food», pp. 44-56.
- SCIENTIFIC ADVICE MECHANISM (SAM) (2017): *Independent Scientific Advice For Policy Making New Techniques in Agricultural Biotechnology*, High Level Group of Scientific Advisors Explanatory Note 02 Brussels, 28 April 2017.
- SHUKLA-JONES A. ET AL. (2018): *Gene editing in an international context: Scientific, economic and social issues across sectors*, OECD Science, Technology and Industry Working Papers 2018/04, Paris <http://dx.doi.org/10.1787/38a54acb-en>.
- SIRSI E. (2017): *Ogm e agricoltura. Evoluzione del quadro normativo. Strategie di comunicazione. Prospettive dell'innovazione*, Editoriale scientifica, Napoli.
- SPRINK T. ET AL. (2016): *Regulatory hurdles for genome diting: process-vs.product-sbased approaches in different regulatory contexts*, «Plant Cell Rep.», pp. 1493-1506.