

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

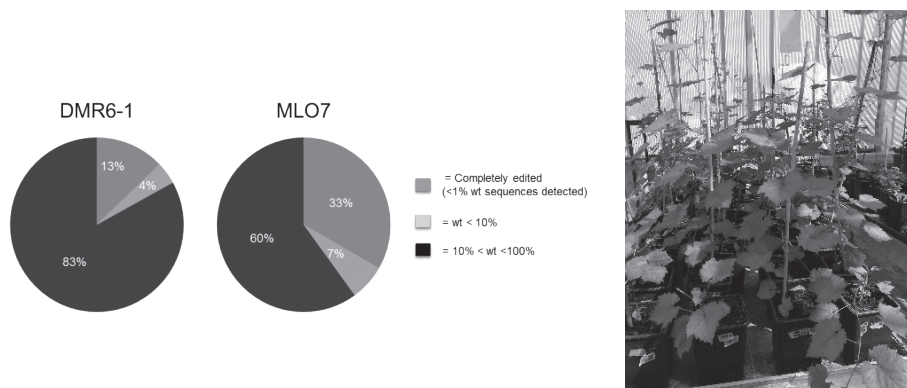


Fig. 1 *Sommario del numero di piante di vite editate nei geni DMR6-1 e MLO7 in base all'entità di editing riscontrato tramite sequenziamento a elevata copertura della regione target. Nell'insero di destra sono visibili alcune delle piante cresciute in serra*

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.