

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.