

Giornata di studio:
Dal laboratorio al campo:
verifiche scientifiche per l'impiego sperimentale
delle piante NGT1

9 luglio 2025

Relatori

Simone Orlandini (coordinatore), Silvio Salvi, Michele Morgante,
Mario Pezzotti, Luigi Cattivelli

Sintesi

Le Tecniche di Evoluzione Assistita (TEA), in particolare quelle basate sull'editing del genoma, rappresentano una svolta nel miglioramento genetico delle piante. Consentono interventi mirati e rapidi, aprendo nuove prospettive per lo sviluppo di varietà più resilienti, sostenibili e adatte alle esigenze dell'agricoltura contemporanea. Grazie a queste tecnologie, è oggi possibile introdurre modifiche genetiche simili a quelle che potrebbero avvenire spontaneamente in natura o attraverso incroci tradizionali, ma con maggiore precisione ed efficienza. Nel 2024 l'Unione Europea ha proposto un nuovo regolamento per disciplinare l'utilizzo delle nuove tecniche genomiche, distinguendo tra piante NGT1 e NGT2. Le prime – oggetto di questo contributo – sono definite come prive di DNA estraneo al breeding gene pool e caratterizzate da modifiche di tipo inserzionale entro un numero limitato di nucleotidi. In Italia, se tali condizioni sono verificate, queste piante possono essere sperimentate in campo previa autorizzazione del Ministero dell'Ambiente, in deroga alle regole previste per gli OGM tradizionali. Per garantire la coerenza tra innovazione scientifica e responsabilità normativa, è fondamentale che il mondo della ricerca – pubblica e privata – adotti criteri rigorosi, trasparenti e condivisi per la verifica delle modifiche introdotte. In questa prospettiva, si propongono alcune “raccomandazioni scientifiche minime” per accompagnare la fase che precede la messa in campo delle varietà NGT1. Il principio guida è il confronto diretto tra il materiale genetico della pianta prima e dopo l'intervento di editing, al fine di verificare l'assenza di modifiche non intenzionali o di sequenze esogene residue. Tali verifiche risultano essenziali anche nei casi in cui, dopo l'editing, si ricorra a incroci e selezioni per eliminare elementi genetici non voluti. Solo un approccio scientificamente solido, tracciabile e documentabile potrà garantire che la pianta rientri a pieno titolo nella categoria NGT1 e sia

conforme alla normativa europea vigente. Queste raccomandazioni mirano a sostenere un'innovazione agricola trasparente e affidabile, fondata su evidenze scientifiche e coerente con il quadro regolatorio, rafforzando la fiducia degli operatori, delle istituzioni e dei cittadini verso le nuove tecnologie applicate all'agricoltura.

SILVIO SALVI¹

Il quadro normativo europeo sulle TEA: sfide e opportunità per la ricerca e l'innovazione

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-alimentari, Università di Bologna, Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA)

Le TEA (Tecnologie di Evoluzione Assistita, anche note come NGT, New Genomic Techniques) rappresentano la frontiera tecnologica per il miglioramento genetico consentendo di modificare in maniera mirata geni specifici al fine di introdurre tratti di interesse, senza il trasferimento di geni tra specie. L'applicazione delle TEA è però ostacolata dal quadro normativo che è inadeguato. La coltivazione di piante TEA è infatti attualmente soggetta alla Direttiva 2001/18/CE, nata per disciplinare le piante OGM. Essa prevede l'autorizzazione preventiva, la valutazione del rischio ambientale e misure di tracciabilità ed etichettatura. Di fatto, ha quasi completamente impedito la coltivazione di piante OGM in Europa. Anche se dal 2012 le tecniche TEA/NGT consentono il miglioramento genetico con mutagenesi mirata, una sentenza della Corte di Giustizia dell'Unione Europea (C-528/16, 25 luglio 2018) ha stabilito che le piante TEA/NGT rientrano nella definizione di OGM, creando un freno all'innovazione e sollecitando la Commissione a proporre una norma specifica. Il 5 luglio 2023 la Commissione ha presentato la proposta di Regolamento COM(2023) 411, che mira a distinguere le piante ottenute tramite TEA/NGT da quelle OGM. La proposta introduce due categorie di piante: NGT-1, con modifiche equivalenti a quelle naturali o ottenibili tramite incrocio, oppure con inserimento di geni della stessa specie - situazione nota come cisgenico, per le quali si propone coltivazione libera, ma con registrazione; NGT-2, che include piante con modifiche più complesse, da assoggettare ad un regime autorizzativo più oneroso, analogo agli OGM. Il testo prevede inoltre il divieto d'uso in agricoltura biologica e regole su proprietà intellettuale e brevetti. Dal 2023 al 2025 la proposta è stata discussa da Parlamento Europeo e Consiglio, che hanno elaborato versioni leggermente differenti, con dibattiti su tracciabilità, limiti genetici e brevetti ed è tuttora

oggetto di negoziazione nei triloghi tra le istituzioni europee. L'auspicio è che si giunga a breve all'approvazione, per consentire alla nostra agricoltura di usufruire del vantaggio dato dalle nuove tecnologie genetiche. In attesa del via libero europeo, il Parlamento Italiano ha semplificato il processo di autorizzazione alla sperimentazione di pieno campo di piante TEA, che può oggi essere ottenuta nel rispetto di restrizioni precise. L'autorizzazione, inizialmente per il 2024, è stata estesa con un emendamento al Dl Agricoltura del 2024, fino al 31 dicembre 2025.

Assisted Evolution Technologies (TEA), also known as New Genomic Techniques (NGT), represent the technological frontier for genetic improvement, allowing specific genes to be modified in a targeted manner in order to introduce traits of interest, without transferring genes between species. However, the application of AET is hampered by an inadequate regulatory framework. The cultivation of AET plants is currently subject to Directive 2001/18/EC, which was created to regulate GMO plants. It requires prior authorisation, environmental risk assessment, and traceability and labelling measures. In effect, it has almost completely prevented the cultivation of GMO plants in Europe. Although TEA/NGT techniques have allowed genetic improvement through targeted mutagenesis since 2012, a ruling by the Court of Justice of the European Union (C-528/16, 25 July 2018) established that TEA/NGT plants fall under the definition of GMOs, creating a barrier to innovation and prompting the Commission to propose specific legislation.

On 5 July 2023, the Commission presented proposal COM(2023) 411 for a Regulation, which aims to distinguish plants obtained through TEA/NGT from GMOs. The proposal introduces two categories of plants: NGT-1, with modifications equivalent to those occurring naturally or obtainable through crossbreeding, or with the insertion of genes from the same species - a situation known as cisgenic, for which free cultivation is proposed, but with registration; NGT-2, which includes plants with more complex modifications, subject to a more burdensome authorisation regime, similar to GMOs. The text also provides for a ban on use in organic farming and rules on intellectual property and patents. From 2023 to 2025, the proposal was discussed by the European Parliament and the Council, which drew up slightly different versions, with debates on traceability, genetic limits and patents, and is still being negotiated in trilogues between the European institutions. The hope is that approval will be reached shortly, to allow our agriculture to take advantage of the benefits offered by new genetic technologies. Pending European approval, the Italian Parliament has simplified the authorisation process for field trials of TEA plants, which can now be obtained subject to

specific restrictions. The authorisation, initially for 2024, has been extended by an amendment to the 2024 Agriculture Decree until 31 December 2025.

MARIO PEZZOTTI¹

Metodologie cellulari e loro ruolo nella definizione delle categorie NGT1 e NGT2

¹ Dipartimento di Biotecnologie. Università di Verona/Edivite; Accademia dei Georgofili

Nel mio intervento ho affrontato il tema delle metodologie cellulari alla base dell'editing genetico nei vegetali e del loro ruolo nella definizione delle categorie regolatorie NGT1 e NGT2. Ho illustrato le principali vie di rigenerazione cellulare, distinguendo tra embriogenesi somatica, che origina da cellule singole e porta alla formazione di embrioni somatici, e organogenesi, che coinvolge tessuti pluricellulari nello sviluppo di organi. La scelta del percorso rigenerativo è cruciale e strettamente dipendente dal genotipo, come dimostrano i numerosi casi di variabilità osservati nell'embriogenesi somatica della vite, che rendono necessario un continuo perfezionamento dei protocolli di coltura.

La trasformazione stabile, realizzata mediante *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes* o bombardamento con microparticelle, costituisce un metodo consolidato ma comporta l'inserimento di sequenze vettoriali nel genoma e dunque la classificazione iniziale come OGM. Per superare questo limite, la ricerca ha sviluppato approcci innovativi come l'induzione de-novo di meristemi, l'editing mediato da virus e diverse tecniche di trasfezione transiente, tra cui la trasfezione di protoplasti o l'impiego di "cell penetrating peptides". In particolare, la rigenerazione da protoplasti nella vite rimane una sfida fortemente genotipo-dipendente, ma rappresenta al contempo un passaggio fondamentale per l'applicazione di strategie DNA-free e per rendere più accessibile l'editing a diverse varietà coltivate.

Un aspetto centrale è la possibilità di accelerare l'eliminazione del transgene, condizione necessaria affinché una pianta trasformata possa essere riclassificata da OGM a NGT1. Secondo lo schema presentato, le piante ottenute tramite vettore devono inizialmente essere considerate OGM; diventano NGT1 solo dopo la segregazione e la verifica genomica dell'assenza di frammenti vettoriali. In caso contrario, la classificazione resta quella di OGM. Le metodologie DNA-free, invece, come le trasfezioni transitorie o l'uso diretto di complessi proteina-RNA, permettono di ottenere piante che rientrano sin dall'inizio nella categoria NGT1 e che quindi possono avere un iter regolatorio più rapido e chiaro.

È stata inoltre discussa la distinzione tra sistemi SDN-3, utilizzati per inserire sequenze provenienti dal breeding gene pool (cisgenesi di precisione), e approcci cisgenici non mirati in cui il vettore viene successivamente rimosso. In entrambi i casi, la regolamentazione europea pone particolare attenzione alla provenienza del DNA introdotto, alla tracciabilità delle modifiche e alla modalità di trasferimento, elementi fondamentali per garantire trasparenza e sicurezza nell'applicazione delle nuove tecnologie.

In conclusione, la combinazione tra strumenti di "genome editing" e metodologie cellulari innovative non rappresenta soltanto una sfida tecnica, ma costituisce anche l'elemento chiave per definire l'inquadramento normativo delle nuove varietà. Il confine tra OGM e NGT1 non è determinato unicamente dalla tecnologia di editing, bensì soprattutto dalle modalità di trasferimento e di rigenerazione cellulare che assicurano, o meno, l'assenza di DNA estraneo, confermando l'importanza di procedure rigorose e di controlli accurati per la piena valorizzazione di queste innovazioni.

In my presentation, I addressed the cellular methodologies underlying gene editing in plants and their role in defining the regulatory categories NGT1 and NGT2. I illustrated the main pathways of cellular regeneration, distinguishing between somatic embryogenesis, which originates from single cells and leads to the formation of somatic embryos, and organogenesis, which involves multicellular tissues in the development of organs. The choice of regenerative pathway is crucial and strictly dependent on the genotype, as demonstrated by the numerous cases of variability observed in somatic embryogenesis in grapevine, which necessitate continuous refinement of cultivation protocols.

*Stable transformation, achieved by *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, or microparticle bombardment, is a consolidated method but requires the insertion of vector sequences into the genome and therefore initial classification as a GMO.*

To overcome this limitation, research has developed innovative approaches such as de novo meristem induction, virus-mediated editing, and various transient transfection techniques, including protoplast transfection and the use of cell-penetrating peptides. In particular, protoplast regeneration in grapevine remains a highly genotype-dependent challenge, but it also represents a fundamental step for the application of DNA-free strategies and for making editing more accessible to various cultivated varieties.

A key aspect is the possibility of accelerating transgene elimination, a necessary condition for a transformed plant to be reclassified from GMO to NGT1. According to the presented scheme, plants obtained via vector must initially be considered GMO; they become NGT1 only after segregation and genomic verification of the

absence of vector fragments. Otherwise, the classification remains GMO. DNA-free methodologies, on the other hand, such as transient transfections or the direct use of protein–RNA complexes, allow us to obtain plants that fall into the NGT1 category from the outset and which can therefore have a faster and clearer regulatory pathway.

The distinction between SDN-3 systems, used to insert sequences from the breeding gene pool (precision cisgenesis), and untargeted cisgenic approaches in which the vector is subsequently removed, was also discussed. In both cases, European regulations place particular emphasis on the origin of the introduced DNA, the traceability of the modifications, and the method of transfer, all of which are essential to ensuring transparency and safety in the application of new technologies.

In conclusion, the combination of genome editing tools and innovative cellular methodologies is not only a technical challenge but also a key element in defining the regulatory framework for new varieties. The boundary between GMOs and NGT1s is not determined solely by the editing technology, but above all by the methods of transfer and cell regeneration that ensure, or otherwise, the absence of foreign DNA, confirming the importance of rigorous procedures and careful controls for the full exploitation of these innovations.

LUIGI CATTIVELLI¹

Le biotecnologie nel miglioramento genetico dei cereali: tra possibilità e regolamentazione

¹ CREA-Centro di Ricerca Genomica e Bioinformatica; Accademia dei Georgofili

I cereali a paglia sono specie caratterizzate da un forte ricambio varietale supportato da una da un'azione di breeding che sfrutta numerosi strumenti sia tradizionali (biodiversità, ed incroci e selezione) sia innovativi (selezione di mutanti attraverso il sequenziamento doppi aploidi, speed breeding, ibridi, Genomic Assisted Selection). In questo contesto NGT offrono nuove opportunità per accelerare ulteriormente l'innovazione varietale. La cisgenesi consente di accelerare il trasferimento di geni tra frumento tenero e frumento duro rendendo di fatto le due specie parte di un unico gene pool. Il genome editing permette di introdurre nuove caratteristiche qualitative e di resistenza a stress in parallelo con gli approcci di mutagenesi accoppiata al sequenziamento (TILLING) o alla digital-PCR (FIND-IT). L'impatto delle NGT nel breeding dei cereali è potenzialmente rilevante, ma molto dipenderà dalla normativa che sarà adottata a livello europeo. Le definizioni di NGT1 e NGT2 hanno subito diverse rivisitazioni nel corso del dibattito tra le istituzioni co-

munitarie, capire con esattezza cosa ricadrà nell'una o nell'altra categoria è fondamentale per decidere quale strategia di breeding mettere in atto. Le due categorie saranno oggetto di diverse regolamentazioni, molto più semplice per le NGT1 rispetto alle NGT2, ed è prevedibile che qualunque tecnologia che consenta di sviluppare piante NGT1 (o comunque non NGT2) sarà preferita. Già oggi esistono nella letteratura scientifica esempi di frumenti/orzi ottenuti mediante genome editing la cui classificazione come NGT1 o NGT2 cambia a seconda di quale versione della normativa viene considerata (versione approvata dal Parlamento vs. versione approvata dal Consiglio agricolo). Infine, è necessario capire se e quali decisioni saranno prese sulla regolamentazione della proprietà intellettuale applicata alle innovazioni genetiche e di conseguenza vedere se e in che misura le PMI potranno accedere all'innovazione sviluppate presso le grandi industrie sementiere.

Straw cereals are species characterized by a high rate of varietal turnover supported by breeding practices that utilize numerous traditional tools (biodiversity, cross-breeding, and selection) as well as innovative ones (selection of mutants through double haploid sequencing, speed breeding, hybrids, and Genomic Assisted Selection). In this context, NGTs offer new opportunities to further accelerate varietal innovation. Cisgenesis accelerates gene transfer between soft wheat and durum wheat, effectively making the two species part of a single gene pool. Genome editing allows new qualitative and stress resistance characteristics to be introduced in parallel with mutagenesis approaches coupled with sequencing (TILLING) or digital PCR (FIND-IT). The impact of NGTs on cereal breeding is potentially significant, but much will depend on the legislation that will be adopted at European level. The definitions of NGT1 and NGT2 have undergone several revisions during the debate among EU institutions, and understanding exactly what will fall into one category or the other is essential for deciding which breeding strategy to implement. The two categories will be subject to different regulations, much simpler for NGT1 than for NGT2, and it is likely that any technology that allows the development of NGT1 (or at least non-NGT2) plants will be preferred. There are already examples in scientific literature of wheat/barley obtained through genome editing whose classification as NGT1 or NGT2 changes depending on which version of the legislation is considered (the version approved by Parliament vs. the version approved by the Agriculture Council). Finally, it is necessary to understand whether and what decisions will be taken on the regulation of intellectual property applied to genetic innovations and, consequently, to see whether and to what extent SMEs will be able to access the innovations developed by large seed companies.