

Convegno:
Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA):
la via italiana per l'innovazione genetica
in agricoltura

9 luglio 2024

Relatori

Amedeo Alpi (coordinatore), Daniele Rosellini, Federico Mirone,
Riccardo Velasco, Andrea Moglia, Alessandro Nicolìa, Teodoro Cardi,
Diana Lenzi, Eugenio Tassinari, Silvio Salvi

Sintesi

Le Tecnologie di Evoluzione Assistita (TEA) permettono di modificare il patrimonio genetico delle piante in modo mirato e simile a quello che potrebbe avvenire in natura attraverso le mutazioni o l'incrocio. Grazie alle TEA sarà possibile salvaguardare la diversità e le peculiarità delle produzioni agrarie e questo è particolarmente importante per l'Italia, dove le numerose eccellenze vegetali sono minacciate dal cambiamento climatico che è sotto gli occhi di tutti. Il colloquio tra mondo della ricerca, produttori e consumatori è necessario nel momento in cui l'Italia e l'Europa devono scegliere se utilizzare queste nuove tecnologie o lasciarle sviluppare ad altri. Il convegno, realizzato congiuntamente tra l'Accademia dei Georgofili e la Società Italiana di Genetica Agraria, intende contribuire a divulgare le TEA e le loro applicazioni per favorire scelte basate sulla scienza.

DANIELE ROSELLINI¹

TEA: cosa sono e a cosa servono

¹ Università degli Studi di Perugia

La prima generazione delle tecnologie per l'ingegneria genetica applicata alle piante coltivate è stata oggetto di ostracismo in tutta Europa, determinando la rinuncia di fatto ad avvalersi di questo strumento di miglioramento genetico (salvo importare grandi quantità di soia, mais e cotone geneticamente modificati). La seconda generazione delle tecnologie genetiche vegetali si è rapidamente sviluppata a partire dall'invenzione di nucleasi artificiali, cioè di enzimi capaci di tagliare la doppia elica del DNA in un punto predetermina-

to. Le prime precise “forbici molecolari” risalgono alla fine del secolo scorso, ma quelle battezzate “CRISPR”, inventate nel 2012 da Jennifer Doudna e Michelle Charpentier (premi Nobel per la chimica nel 2020) rappresentano un enorme salto di qualità per quel che riguarda la facilità di progettazione e la semplicità d’uso. Non c’è quasi ormai laboratorio di genetica agraria in Italia che non utilizzi il sistema CRISPR per ricerche di base o applicate e anche alcune aziende sementiere sono interessate. A seguito del taglio del DNA in corrispondenza del gene che si vuole modificare è possibile ottenere con facilità l’inattivazione del gene. Diversi caratteri utili possono essere ottenuti con questa strategia, come resistenza a malattie fungine, miglioramento della qualità nutrizionale, modifiche dello sviluppo, assenza di semi, durezza dei prodotti, solo per fare alcuni esempi. Un obiettivo un po’ più sofisticato è quello di inserire piccole modifiche nella sequenza del gene progettate per modificarne la funzione. In ogni caso, il prodotto finale (la pianta o il suo prodotto) non contiene sequenze di DNA estranee, derivanti da altri organismi non sessualmente compatibili, e in questo differisce dalle piante geneticamente modificate di prima generazione che contengono essenzialmente geni derivanti da batteri. Un’altra tecnologia particolarmente interessante per l’agricoltura italiana è la cisgenesi. Si tratta dell’inserimento in una pianta coltivata di tratti di DNA presi da individui non coltivati della stessa specie, o da specie affini. Di nuovo, c’è una differenza rispetto al passato, perché i tratti di DNA inseriti potrebbero teoricamente essere introdotti anche mediante incrocio. L’interesse della cisgenesi è grande per la nostra agricoltura. Valga l’esempio della vite, in cui si potrebbero inserire geni per la resistenza a gravi malattie fungine, la peronospora soprattutto, in vitigni tradizionali, cosa impossibile da fare con l’incrocio, che fa perdere l’identità genetica del vitigno. Per favorire la corretta comprensione delle tecniche di editing del genoma e della cisgenesi, la SIGA, con l’aiuto del giornalista scientifico Giovanni Carra da, ha coniato e adottato il termine TEA – Tecnologie di Evoluzione Assistita. L’idea che ci ha mossi è che per sostenere queste nuove tecnologie fosse necessario liberarsi del fardello comunicativo del termine OGM, che ormai ha un’accezione negativa per il grande pubblico. Constatiamo che in pochi anni il termine TEA è largamente utilizzato tra gli operatori del settore agricolo e in generale nei media, e ci auguriamo che serva per far sì che le nuove tecnologie genetiche vengano adottate per l’innovazione genetica in agricoltura in Italia e in Europa.

FEDERICO MIRONE¹*Campo sperimentale di riso TEA resistente a brusone*¹ Università degli Studi di Milano

Il brusone (agente eziologico *Magnaporthe oryzae*) è un fungo patogeno in grado di infettare la pianta di riso causando a livello globale importanti riduzioni di resa e qualità della granella. La severità dei danni è variabile e strettamente correlata alle condizioni ambientali, alla disponibilità di agrofarmaci efficaci e alla resistenza innata delle diverse cultivar. L'impossibilità di utilizzare triciclazolo e il diffondersi di resistenze ad azoxystrobin nei patotipi europei di brusone, ha incoraggiato la costituzione di varietà geneticamente resistente all'infezione. Per tale ragione, attraverso l'analisi della bibliografia scientifica, tre geni codificanti per fattori di suscettibilità a brusone, Pi21 (Os04g0401000), HMA1 (Os04g0469000) e HMA2 (Os04g0464100) sono stati selezionati come targets per mutagenesi sito-diretta mediante tecnologia CRISPR/Cas9. Linee edidate con mutazioni omozigoti che causano il silenziamento dei tre geni sono state selezionate e propagate per l'identificazione di individui non transgenici. Dopo un primo screening di laboratorio per resistenza a brusone, le piante mutanti sono state oggetto della richiesta per la valutazione in condizioni di pieno campo attraverso la realizzazione di un sito sperimentale. Richiesta culminata con l'approvazione e la costituzione di un campo di sperimentazione ove valutare diversi tratti agronomici e la resistenza a brusone in condizioni reali di coltivazione.

ANDREA MOGLIA¹*TEA per il miglioramento della tolleranza agli stress biotici e abiotici in pomodoro e melanzana*¹ Università di Torino

I cambiamenti climatici stanno determinando veloci variazioni nell'intensità e diffusione degli stress ambientali che possono a loro volta influenzare le interazioni tra piante e patogeni. Le Tecniche di evoluzione assistita, tra le quali il genome editing e soprattutto la tecnologia CRISPR/Cas9, rappresentano uno strumento importante per sviluppare piante in grado di tollerare stress biotici e abiotici, garantendo la sicurezza alimentare globale nel prossimo futuro.

Downy Mildew Resistance 6 (DMR6) è un gene di suscettibilità che codifica per un enzima coinvolto nel catabolismo dell'acido salicilico (Salicylic

acid, SA), e la sua disattivazione in pianta causa un aumento dei livelli di SA conferendo tolleranza ad ampio spettro a infezioni da parte di batteri, oomiceti e funghi.

Il gene DMR6-1 è stato disattivato tramite tecnologia CRISPR/Cas9 nella varietà di pomodoro 'San Marzano' e in quella di melanzana 'Black Beauty'.

Le linee editate di pomodoro sottoposte a condizione di stress idrico (blocco dell'irrigazione per 2 settimane) hanno evidenziato un meccanismo di tolleranza allo stress grazie un processo di drought avoidance. Le linee mutanti di pomodoro hanno inoltre dimostrato una maggiore tolleranza all'infezione causata da *Phytophthora infestans* rispetto alle linee controllo.

Le linee editate di melanzana sono state invece caratterizzate solamente per la loro risposta a stress biotici: i test di patogenicità hanno rivelato una miglior tolleranza alle infezioni causate da *Phytophthora capsici* e *Phytophthora infestans* rispetto alle linee controllo.

L'intervento di editing genomico sul gene DMR6-1 può rappresentare una strategia innovativa di miglioramento genetico nell'ottica dell'ottenimento di piante tolleranti a stress biotici e abiotici.

ALESSANDRO NICOLIA¹

Le TEA per la resistenza a orobanche in pomodoro

¹ CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo; CNR - Istituto di Bioscienze e Biorisorse

Il miglioramento genetico del pomodoro (*Solanum lycopersicum* L.) è influenzato dalla tipologia di filiera a cui è destinata la bacca: a) fresco (piante a crescita indeterminata, allevate in serra); b) trasformato (piante a crescita determinata, allevate in pieno campo). L'allevamento in pieno campo espone la coltura di pomodoro a stress biotici e abiotici propri di questa condizione di allevamento. Tra gli stress biotici, si annoverano certamente le piante parassite appartenenti al genere *Phelipanche* e in particolare alla specie *Phelipanche ramosa* L. anche nota come orobanche. In Italia l'orobanche può causare perdite produttive ingenti ed è in rapida diffusione nei terreni vocati alla coltivazione del pomodoro. Le piante di orobanche producono infatti una grande quantità di semi che possono rimanere vitali nel suolo per molti anni. Nel progetto BIOTECH-Cisget (Cisgenesis and genome editing in tomato) finanziato dal MASAF, sono state utilizzate le TEA (Tecnologie di Evoluzione Assistita) e in particolare la tecnologia CRISPR/Cas9, per spengere i geni di pomodoro responsabili della biosintesi degli strigolattoni. Questi ultimi, rilasciati nel suolo attraverso gli essudati radicali, inducono la germinazione dei semi di

orobanche, che parassitizzano successivamente l'apparato radicale. Gli essudati radicali delle diverse linee di pomodoro ottenute tramite le TEA, mostrano una riduzione della capacità germinativa di semi di orobanche fino all'80%. Inoltre, l'analisi fenotipica delle diverse linee prodotte ha messo in evidenza differenze significative ascrivibili specificatamente all'inattivazione di singoli geni della biosintesi degli strigolattoni in pomodoro. Le linee di pomodoro prodotte nel progetto BIOTECH-Cisget saranno testate in esperimenti di pieno campo per verificarne la resistenza ad orobanche e verranno anche saggiate come porta innesto di varietà commerciali (es. ibridi) al fine di verificare il mantenimento degli standard qualitativi della bacca.

TEODORO CARDI¹

Stato dell'arte sull'iter legislativo di riconoscimento TEA non OGM

¹ CNR - Istituto di Bioscienze e Biorisorse, Portici (NA)

Le piante prodotte attraverso mutagenesi mirata (mediante genome editing) e cisgenesi (piante NGT /TEA), pur non contenendo materiale genetico non proveniente dal cosiddetto breeders' gene pool, in Europa sono attualmente considerate a tutti gli effetti OGM e regolamentate dalla Direttiva 2001/18/CE, recepita in Italia dal D.Lgs. n. 224/2003. Nel tentativo di adeguare la normativa per questo tipo di piante a quella introdotta in molti altri Paesi e per favorire la loro adozione anche per favorire la competitività del sistema agricolo europeo e raggiungere gli obiettivi del Green Deal, lo scorso luglio la Commissione EU ha avanzato una proposta di Regolamento per il successivo esame e approvazione da parte del Parlamento e del Consiglio. La proposta, sotto forma di *lex specialis*, regola in maniera specifica le piante NGT, classificandole in due categorie: NGT1, considerate equivalenti a quelle prodotte con metodologie convenzionali di miglioramento genetico, e quindi di fatto escluse da quanto previsto dalla Direttiva 2001/18, e NGT2, che, pur non contenendo materiale genetico transgenico, non sono considerabili equivalenti ai prodotti del miglioramento genetico tradizionale e quindi richiedono, secondo un criterio di proporzionalità, procedure di valutazione del rischio e di monitoraggio simili a quelle dei prodotti OGM "convenzionali". La proposta di Regolamento della Commissione è stata approvata definitivamente dal Parlamento, dopo alcune modifiche, mentre il Consiglio non è riuscito a raggiungere, per l'opposizione di alcuni Stati Membri, un accordo, impedendo la discussione nel "trilogo" e la definitiva approvazione di un testo condiviso nell'ambito di questa legislatura. I maggiori temi controversi inclu-

dono: le misure di coesistenza e di opt-out per le piante NGT2, la brevettabilità delle varietà NGT, l'etichettatura dei prodotti NGT2, l'esclusione dalla categoria 1 delle piante resistenti a erbicidi. A livello italiano, nella primavera 2023 è stato approvato il DL n. 39 (convertito dalla L. 13 giugno 2023, n. 68), che regola, nelle more dell'adozione, da parte dell'Unione europea, di una disciplina organica in materia, e fino al 31 dicembre 2024, l'emissione deliberata nell'ambiente di organismi prodotti con tecniche di editing genomico mediante mutagenesi sito-diretta o di cisgenesi a fini sperimentali e scientifici, a sostegno di produzioni vegetali in grado di rispondere in maniera adeguata a condizioni di scarsità idrica e in presenza di stress ambientali e biotici di particolare intensità. L'emissione dovrà avvenire secondo quanto previsto dal citato D.Lgs. 224, con alcune semplificazioni, ad es. l'esclusione della valutazione del rischio per l'agrobiodiversità, i sistemi agrari e la filiera agroalimentare.