



Genome editing per l'agricoltura italiana

Esempi di progetti in corso



Roma, luglio 2019

Genome editing e agricoltura

Le tecnologie di *genome editing*, (note anche come *New Breeding Technologies*, NBT, se applicate alle piante per l'agricoltura) hanno aperto nuove importanti possibilità nel miglioramento genetico delle piante di interesse agrario.

A livello globale i progetti si possono dividere in svariati i filoni di ricerca, tenendo presente che le tecnologie sono in rapida evoluzione e dunque è possibile che le applicazioni aumenteranno:

1. Introduzione di caratteristiche favorevoli presenti in alcune varietà coltivate, ad es. la maggiore conservabilità dei prodotti o la resistenza ai parassiti, ma assenti in altre varietà tradizionali molto apprezzate per altre caratteristiche. Questo permette di evitare due problemi del miglioramento genetico classico tramite incroci: i tempi lunghi e/o la perdita dell'identità genetica delle varietà tradizionali.
2. Eliminazione di caratteristiche negative per la produzione o per l'alimentazione ma difficili o impossibili da eliminare tramite miglioramento genetico classico, ad esempio l'allergenicità.
3. Neo-domesticazione. Con questo termine si indica l'introduzione, in specie selvatiche, di mutazioni caratteristiche delle piante coltivate, che determinano, ad esempio, l'aumento della grandezza e del numero dei frutti, o la ritenzione dei semi maturi nella spiga. In tal modo specie selvatiche possono diventare economicamente coltivabili e aumentare la biodiversità coltivata fornendo prodotti con caratteristiche migliori per sapore, contenuto di sostanze nutritive, tolleranza a condizioni ambientali avverse, resistenza a particolari patogeni, ecc.
4. *Rewilding* delle specie coltivate. Consiste nella reintroduzione nelle piante coltivate di caratteri che sono andati persi durante la storia del miglioramento genetico, in particolare la tolleranza a stress ambientali. Sostanzialmente, si tratta del reciproco della neodomesticazione. Utilizzando le informazioni sui geni e le mutazioni coinvolte nell'espressione di questi caratteri nelle specie selvatiche imparentate, il genome editing consente di reintrodurre nelle specie coltivate, rapidamente e in maniera mirata, i caratteri di rusticità desiderati, preservando le caratteristiche utili per la coltivazione. Ciò è particolarmente importante in uno scenario di rapidi cambiamenti climatici, con conseguente comparsa di nuovi stress per le colture tradizionali.

Il quadro della ricerca in Italia

Di seguito riportiamo esempi sintetici di progetti di *genome editing* in atto nelle istituzioni pubbliche di ricerca italiane. Ricordiamo anche che l'editing è una tecnologia relativamente semplice, che non richiede grandi investimenti e quindi ideale per essere adeguatamente sfruttata sia dalla ricerca pubblica che dalle piccole imprese sementiere e vivaistiche che caratterizzano l'agricoltura italiana. Tali motivi inducono molti analisti a ritenere che il *genome editing* possa offrire notevoli opportunità per la creazione di *startup* innovative di cui tanto bisogno ha il nostro Paese.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum L.

CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Pontecagnano Faiano (SA)

Carattere ricercato

Resistenza a piante parassite (orobanche)



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il pomodoro appartiene alla famiglia delle Solanacee ed è una specie molto importante per il *Made in Italy* agroalimentare, usato come prodotto fresco, coltivato in serra e in pieno campo, e per la trasformazione industriale, coltivato generalmente in pieno campo. Sono presenti moltissime varietà con svariate caratteristiche agronomiche della pianta e frutti con forme, colori e aspetti qualitativi diversi. Per la specie coltivata e quelle affini, sono inoltre disponibili considerevoli informazioni genetiche e genomiche che facilitano l'applicazione delle nuove tecnologie di miglioramento genetico.

Alcune specie di piante parassite appartenenti ai generi *Orobanche spp.* e *Phelipanche spp.* attaccano piante di interesse agrario. In pomodoro, la specie *Phelipanche ramosa* causa notevoli danni e nuove infestazioni stanno emergendo nei Paesi Europei (Francia, Spagna, Regno Unito, Italia). Il controllo chimico (es. trattamenti erbicidi nel terreno) e agronomico (rotazioni o allelopatia) dei parassiti è estremamente difficile per il fatto che i semi di queste specie parassite rimangono vitali nel terreno per oltre 15 anni; inoltre non sono note resistenze naturali in pomodoro o specie compatibili. Il danno per il pomodoro è intorno a decine di milioni di euro all'anno negli ultimi anni.

Strategia e stato attuale del progetto

L'attività di ricerca in corso si pone come obiettivo quello di utilizzare le tecniche di genome editing per creare piante di pomodoro in cui il corretto riconoscimento parassita-ospite sia bloccato per prevenire l'instaurarsi del parassitismo. Gli obiettivi ultimi della ricerca sono quindi l'aumento della potenzialità produttiva e la riduzione dell'uso di fitofarmaci

Nessuna varietà commerciale di pomodoro presenta il carattere di resistenza alle specie parassite. L'introduzione di tale resistenza in varietà commerciali presenterebbe quindi ovvi vantaggi in termini agronomici (coltivare terreni infestati prima abbandonati), economici (nessuna perdita produttiva, minori interventi agronomici e quindi riduzione dei costi) e ambientali.

Sono stati ottenuti i primi germogli da cui si otterranno piante che saranno sottoposte ad analisi genetica per verificare la presenza delle mutazioni nei geni desiderati. In caso positivo, verranno cercati nella generazione successiva individui con le mutazioni ma senza costruito transgenico.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum L.

CREA, Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo
Pontecagnano Faiano (SA)

CNR - Istituto di BioScienze e Biorisorse, Portici (NA)

Carattere ricercato

Tolleranza a stress da eccesso di sale nel terreno



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Condizioni ambientali sfavorevoli, quali ridotta disponibilità idrica, alta concentrazione di sale nel suolo e alte temperature, comportano spesso una riduzione della crescita e dello sviluppo. Nelle specie coltivate, tra cui il pomodoro, queste condizioni determinano una grave riduzione della produttività. Le piante rispondono normalmente allo stress modificando l'espressione dei propri geni, anche se non sempre l'attivazione è sufficientemente veloce da conferire resistenza. Scopo del progetto in questo caso è attivare le risposte naturali della pianta alle condizioni ambientali avverse utilizzando il genome editing, per ottenere piante più resistenti.

Strategia e stato attuale del progetto

L'aminoacido prolina agisce da osmoprotettore, per cui la modulazione del suo contenuto intracellulare è importante per prevenire lo stress osmotico. Mediante tecniche di genome editing in geni che controllano il catabolismo della prolina verrà inibita la sua degradazione e quindi favorito l'accumulo.

Sono stati ottenuti i costrutti per il genome editing ed essi sono stati utilizzati in esperimenti pilota per verificare la loro efficienza per l'induzione di mutazioni. Gli esperimenti per la produzione di germogli "editati" sono in corso e nella generazione successiva saranno selezionati individui con le mutazioni desiderate ma senza il costrutto transgenico utilizzato per la loro induzione.

Specie: Pomodoro

Solanum lycopersicum

CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo,
Monsampolo del Tronto (AP)

CREA - Centro di ricerca Orticoltura e Florovivaismo,
Pontecagnano Faiano (SA)



Carattere ricercato

Aumento del grado Brix (zuccheri solubili) e della conservabilità dei frutti

Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Una delle principali sfide del miglioramento genetico del pomodoro è il miglioramento della qualità del frutto. Il grado Brix, o contenuto di Solidi Solubili, determinato principalmente dal contenuto in glucosio e fruttosio, è uno dei principali parametri qualitativi. L'ottenimento di varietà di pomodoro, destinate al mercato fresco o all'industria, aventi un elevato grado Brix rappresenta un risultato di grande importanza sia dal punto di vista economico, in quanto aumenta il valore commerciale del prodotto, sia qualitativo. L'elevato grado Brix è, infatti, anche espressione di un alto contenuto in sostanze aromatiche, un migliore contenuto vitaminico e una maggiore conservabilità del prodotto. L'impiego di tipologie di pomodoro espressione del territorio e della tipicità italiana rappresenta inoltre un valore aggiunto di fondamentale importanza sia per il miglioramento genetico sia per la valorizzazione del germoplasma di pomodoro.

Strategia e stato attuale del progetto

In specie selvatiche affini al pomodoro coltivato è stata identificata una mutazione in un gene che codifica per l'enzima invertasi che scompone il saccarosio in glucosio e fruttosio. In questo progetto ci si propone di applicare le tecniche di genome editing in pomodoro per riprodurre la mutazione in diversi genotipi di pomodoro da mensa e da industria, al fine di aumentare il contenuto in solidi solubili e quindi il grado Brix.

Sono perciò in corso gli esperimenti per riprodurre, mediante tecniche di gene editing, direttamente la mutazione nel gene presente nel pomodoro coltivato.

Specie: Frumento duro

Triticum durum

CREA-Centro di Ricerca Cerealicoltura e Colture Industriali (CREA-CI), sede di Foggia

Carattere ricercato

Riduzione dell'intolleranza al glutine



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il frumento duro è la prima coltura erbacea d'Italia in termini di superficie coltivata. Le filiere agroindustriali generate dal frumento duro sono tra le più importanti del nostro Paese e, fra queste, la filiera della pasta genera un'importante voce di export alimentare. Insieme al pane, la pasta rappresenta uno dei principali prodotti alimentari contenenti glutine, un complesso di proteine, gliadine e glutenine, che conferisce agli impasti a base di farine e semole le caratteristiche proprietà visco-elastiche. In pazienti predisposti geneticamente, porzioni tossiche (epitopi) presenti nella frazione proteica del glutine rappresentata dalle gliadine sono in grado di innescare una reazione autoimmune tipica della celiachia, che induce gravi danni alla mucosa intestinale e che scatena sintomi sistemici tra cui problemi alla pelle, al fegato, al cervello, al cuore e ad altri organi. La celiachia è una delle malattie croniche più diffuse al mondo. L'unica strategia attualmente messa in atto per contrastare gli effetti nocivi di questa malattia consiste nella somministrazione di alimenti privi di glutine.

Gli approcci di miglioramento genetico per risolvere questo problema hanno finora riguardato principalmente il frumento tenero e sono stati finalizzati a disattivare i geni codificanti per alcune classi di gliadine in modo da impedire la sintesi delle corrispondenti proteine e di ridurre così la quantità di epitopi tossici. In alcuni casi questi approcci hanno consentito di abbassare l'indice di glutine e, quindi, il grado di tossicità degli sfarinati. Esso tuttavia resta ancora troppo elevato perché questi sfarinati si possano considerare idonei al consumo da parte di pazienti celiaci.

Strategia e stato attuale del progetto

Abbiamo isolato un gene che codifica per una w-secalina, una proteina di segale analoga alle gliadine del frumento, che contiene una porzione (il decapeptide costituito dagli aminoacidi QQPQRPPQPF) in grado di impedire, in biopsie intestinali di pazienti celiaci, l'attivazione della risposta immunitaria indotta dagli epitopi tossici delle gliadine. L'introduzione di questo decapeptide protettivo nei geni codificanti per le gliadine di frumento duro potrebbe offrire nuove strategie contro la celiachia.

Nell'ambito del progetto Wh-ITALY, è in atto una strategia di genome editing finalizzata a convertire alcuni degli epitopi tossici presenti nei geni endogeni delle gliadine del frumento duro in peptidi protettivi. Ciò al fine di raggiungere, nella frazione gliadinica, un rapporto tra numero di peptidi protettivi e numero di epitopi tossici tale da ottenere un'azione antagonista in grado di proteggere la mucosa intestinale dall'azione tossica della stessa frazione gliadinica. Recentemente il genoma di frumento duro è stato sequenziato in un progetto internazionale a guida Italiana e le sequenze dei geni codificanti per le gliadine sono note. Grazie a ciò sono stati avviati gli esperimenti finalizzati a modificare in maniera mirata questi geni mediante l'approccio di genome editing CRISPR/Cas9 al fine di ottenere nuovi genotipi di frumento duro caratterizzati da un glutine con elevate proprietà tecnologiche e bassa tossicità.

Specie: Orzo e Frumento duro

Hordeum vulgare

Triticum durum



Centro di Ricerca per la Genomica e la Bioinformatica
Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria

Carattere ricercato

Incremento della produttività e della qualità

Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

L'orzo e il frumento sono tra le specie maggiormente coltivate al mondo. La domesticazione di queste specie è iniziata 10.000 anni fa nella Mezzaluna Fertile. Millenni di miglioramento ad opera dell'uomo hanno fatto sì che le varietà che coltiviamo al fine di produrre cibo abbiano caratteristiche differenti rispetto ai progenitori tali da rendere orzo e frumento tra i cereali fondamentali nella dieta di molte popolazioni. In particolare, il frumento duro rappresenta uno dei simboli del *Made in Italy*, e l'Italia ne è un importante produttore a livello globale, seppur non autosufficiente.

Nel 2019 l'estensione della superficie italiana coltivata a frumento duro è diminuita e si prevede un ulteriore calo di produttività causato da stress biotici e abiotici (patogeni e condizioni ambientali avverse). Un ulteriore aspetto che vincola il nostro Paese all'importazione è la necessità di utilizzare frumento duro di buona qualità nell'industria pastaia.

Strategia e stato attuale del progetto

L'obiettivo principale del progetto prevede di incrementare resa e qualità nel frumento duro. Si tratta di un obiettivo ambizioso in cui si attendono risultati intermedi a breve termine e risultati definitivi a lungo termine. Sono state quindi attuate diverse strategie che permettessero di operare su più livelli.

In questo progetto, l'orzo è stato scelto come specie modello in cui indagare e dissezionare i meccanismi molecolari che regolano il riempimento del seme durante le fasi precoci della maturazione. L'orzo è infatti una specie con un genoma più piccolo e più semplice da manipolare rispetto a frumento. Grazie alla disponibilità della sequenza del genoma di orzo, è stato possibile identificare i membri di una delle famiglie geniche che regolano il trasporto degli zuccheri nel seme. La tecnologia CRISPR/Cas9 ci ha quindi permesso di inattivarli per capire come funzionano. Questo risultato rappresenta uno dei risultati intermedi della ricerca di base e serve a capire come funziona un gene nel sistema pianta e come quindi modularne l'attività per aumentare la performance della pianta durante la crescita.

Parallelamente alla ricerca nella specie modello, il progetto sta operando direttamente sul frumento duro. Sono stati selezionati geni già studiati nel riso che agiscono come freni molecolari durante le fasi di determinazione del numero di semi e della dimensione del seme. Anche in questo caso si sta sfruttando la tecnologia CRISPR/Cas9 per ridurre l'attività di alcuni dei geni, rilasciando così i freni molecolari che limitano alcune fasi dell'accrescimento.

Specie: Vite

Vitis vinifera

Università degli studi di Verona

CREA Conegliano Veneto

Università degli studi di Udine

Fondazione Mach

Caratteristica desiderata

Resistenza a peronospora ed oidio



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

La vite europea (*Vitis vinifera sativa*) appartiene al genere *Vitis*, famiglia delle Vitaceae, è la specie frutticola più coltivata al mondo. I suoi frutti, chiamati bacche, vengono raccolti principalmente per la vinificazione (68%) ma anche per fornire uva da tavola fresca (30%), uvetta (2%) e prodotti minori, come succo d'uva, gelatina, etanolo, aceto, olio di semi d'uva, acido tartarico e fertilizzanti. L'Italia, insieme a Francia e Spagna, è tra i principali paesi produttori di vino e uva da tavola al mondo. L'Italia, con i suoi 350 vitigni locali, possiede il più ampio patrimonio genetico di *Vitis vinifera*, da cui si ricava una produzione molto differenziata e tipica. Nel 2007 la decifrazione del suo genoma ha aperto la strada per la applicazione delle nuove tecniche di miglioramento

L'oidio e la peronospora sono i maggiori patogeni fungini che attaccano la vite. Le vigne coprono solo il 3% della superficie agricola dell'Unione europea, ma sono responsabili per il 65% del consumo di prodotti antifungini, principalmente contro oidio e peronospora. I trattamenti presentano un costo e un danno ambientale, oltre che un aggravio per gli agricoltori in termini di tempo.

Strategia e stato attuale del progetto

Mediante genome editing si ottengono mutazioni specifiche nella sequenza di una serie di geni responsabili della sensibilità della vite ai due patogeni fungini, producendo così la pianta di vite insensibile alla malattia. Risultati simili sono impossibili da ottenere attraverso tecniche di incrocio e selezione. L'obiettivo è quello di produrre le varietà elite, costituenti il nostro patrimonio genetico, immuni da malattie fungine e rendere la viticoltura più sostenibile sia dal punto di vista ambientale che da quello economico.

Sono stati identificati i geni e messe a punto le condizioni sperimentali per operare sulle varietà di viti locali attraverso alcune metodologie disponibili solo presso i laboratori italiani

Specie: Vite

Vitis vinifera – Varietà da tavola

Università degli studi di Verona

CREA Conegliano Veneto

Università degli studi di Udine

Fondazione Mach

Caratteristica desiderata

Uve da tavola apirene (senza semi)



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Le varietà di vite apirene sono apprezzate dai consumatori e per questo hanno un valore di mercato superiore. Le varietà apirene sono quasi solamente americane, spagnole e israeliane, su cui gli italiani pagano royalties.

Riprodurre il carattere in varietà italiane (come ad esempio l'uva Italia, prodotto tipico e orgoglio italiano, ma che possiede semi di grosse dimensioni) sarebbe una grande opportunità per espandere il loro mercato. Dal punto di vista genetico è già conosciuto il gene (un fattore di trascrizione) che regola la formazione del seme. Mutazioni in questo gene bloccherebbero lo sviluppo del seme rendendo la varietà apirena.

Strategia e stato attuale del progetto

I costrutti genici per la mutazione del gene citato sono in fase avanzata di preparazione. Le piante mutate ottenute entreranno in produzione entro i tre anni successivi. La durata del procedimento è simile a quella richiesta con un incrocio tra varietà con semi e senza semi, tuttavia utilizzando il genome editing si mantiene l'identità della varietà, il che è impossibile con i metodi di miglioramento genetico convenzionali.

Specie: Riso

Oryza sativa ssp. *japonica*

Dipartimento di Bioscienze
Università degli Studi di Milano

Carattere ricercato

Ottimizzazione del tempo di fioritura per l'agricoltura italiana



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Il riso (*Oryza sativa*) è uno dei grandi attori della storia dell'agricoltura mondiale. Si è diffuso come alimento fondamentale prima in Asia e poi nel resto del mondo: oggi il riso è superato solo dalla canna da zucchero e dal mais in termini di produzione globale. Per ragioni storiche, ambientali e culturali, i grandi produttori globali di riso si trovano in Asia, ma l'Italia è il primo produttore europeo e uno dei primi dieci esportatori mondiali e la qualità delle varietà coltivate in Italia è famosa nel mondo.

Il riso è stato domesticato nelle aree tropicali dell'Asia orientale, in climi caldi nei quali l'assenza di una stagione veramente fredda consente un ciclo di coltivazione lungo. Fra le innumerevoli varietà di riso coltivate nelle aree tropicali e subtropicali si trovano caratteristiche di grande interesse agronomico anche per l'Italia, fra cui la resistenza ad alcuni patogeni fungini, l'aroma (ad esempio nei risi Basmati) e la produttività.

In Italia, il riso è soprattutto coltivato nel nord, in regioni con clima continentale, nel periodo caldo di maggio-settembre. Le varietà coltivate in Italia da secoli hanno accumulato mutazioni che ne anticipano la fioritura consentendo la produzione di seme nei nostri ambienti. Il risultato è che, quando coltivate in Italia, le varietà tropicali, che non hanno tali mutazioni, sono spesso molto poco produttive perché hanno un ciclo colturale troppo lungo: quando il seme si sta ancora sviluppando, i primi freddi autunnali impediscono la maturazione.

La maggior parte dei geni che regolano il periodo di fioritura è ora conosciuta. Le mutazioni di tali geni accelerano o ritardano l'inizio della fioritura.

Strategia e stato attuale del progetto

Un obiettivo principale è adattare velocemente varietà tropicali pregiate alla coltivazione nei nostri climi, accelerandone la fioritura e quindi accorciando il ciclo colturale, aumentando in tal modo la biodiversità a disposizione degli agricoltori italiani, anche per lo sviluppo di nuove varietà. Un secondo obiettivo è ritardare la fioritura in varietà pregiate (nostrane o tropicali) per aumentarne la produttività in climi caldi.

Sono già state identificate mutazioni naturali o indotte in passato tramite mutagenesi casuale (chimica o per radiazioni ad alta energia) in geni che regolano la fioritura. Alcune di queste mutazioni sono state identificate in varietà commerciali italiane. L'introduzione di tali mutazioni in altre varietà di interesse, italiane o tropicali è in corso tramite tecnologie CRISPR/Cas9 di genome editing.

I mutanti di uno dei geni sono già disponibili e sono in sperimentazione in serra e potrebbero essere provati in campo fin dalla stagione 2019. Piante mutanti di prima generazione per un altro gene sono al momento in serra. Infine, per un terzo gene, i costrutti per l'editing sono pronti per essere inseriti in varietà tropicali di tipo aromatico per accelerarne fioritura e ciclo.

Specie: Camelina

Camelina sativa

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)
Istituto di Biologia e Biotecnologia Agraria
Milano

Carattere ricercato

Riduzione di composti antinutrizionali nei mangimi



Rilevanza della specie e della caratteristica che si desidera introdurre

Camelina sativa è una oleaginosa appartenente alla famiglia delle *Brassicaceae*, la stessa famiglia della colza. È una pianta in grado di adattarsi a diversi ambienti e di crescere in terreni marginali e poco fertili. Camelina ha un seme ricco in olio (35-40%) composto principalmente da omega-3 e proteine (20-25%) di buona qualità. Fino al 1940 camelina è stata ampiamente coltivata in diversi paesi dell'Europa, ma in seguito abbandonata a favore di specie più redditizie. L'interesse per camelina è però in rapido aumento, per i bassi input agronomici necessari alla sua coltivazione rispetto ad altre oleaginose e il suo utilizzo, sia per la produzione di biocarburanti sia per il settore zootecnico nella preparazione dei mangimi. In particolare, l'introduzione nella dieta delle galline ovaiole permette di aumentare il contenuto in Omega-3 e composti antiossidanti nelle uova.

Alcuni studi recenti stanno dimostrando che l'inserimento di pannello di camelina nei mangimi, attualmente ammesso per il 10%, potrebbe essere portato al 20% ed oltre se si riuscisse a ridurre il contenuto dei glucosinolati (composti antinutrizionali il cui catabolismo produce metaboliti tossici) presenti nei semi. La riduzione del contenuto in glucosinolati mediante miglioramento genetico classico (per incroci fra diverse varietà) è piuttosto complicato e lungo. Infatti la via biosintetica dei glucosinolati è molto complessa (sono coinvolti più di 50 geni diversi) e non è facile trovare tipi di camelina con basso contenuto di glucosinolati.

Strategia e stato attuale del progetto

I geni responsabili del trasporto di sostanze dalle foglie al seme possono essere utili per ridurre la presenza di fattori antinutrizionali nei semi. In particolare, l'inattivazione di un gene identificato nella pianta modello *Arabidopsis thaliana* riduce fortemente l'accumulo dei glucosinolati nel seme di *Arabidopsis*.

Camelina è una pianta alloesaploide, e quindi possiede sei copie del gene in questione, che devono essere inattivate contemporaneamente: un risultato molto difficile da ottenere, ma reso molto più facile utilizzando genome editing mediante CRISPR/Cas9. Utilizzando questa tecnologia, dopo diversi cicli di screening sono state individuate piante che mostrano l'inattivazione di tutte e sei le copie del gene. I semi saranno ora analizzati per valutare il contenuto in glucosinolati.