

## BIOTECNOLOGIE SOSTENIBILI PER L'AGRICOLTURA ITALIANA

Il miglioramento genetico vegetale rappresenta uno dei settori attraverso i quali è possibile aumentare competitività e sostenibilità del sistema agricolo anche rispetto alle sfide della efficienza produttiva, dei cambiamenti climatici, della sostenibilità delle produzioni, con riferimento soprattutto alla riduzione dell'uso dei pesticidi.

Il moderno miglioramento genetico affronta quelli che rappresentano gli obiettivi classici di breeding (resistenze, produttività, qualità) sfruttando una vasta gamma di tecniche, alcune più tradizionali come l'incrocio intraspecifico ed interspecifico o la mutagenesi, ed altre basate sulle moderne biotecnologie, che spaziano dall'uso dei marcatori molecolari, inclusa la MAS (marker assisted selection) fino alla trasformazione genetica. Entrambe queste tecnologie si sono sviluppate a partire dagli anni '90 ed hanno subito una continua evoluzione che ne ha visto sempre più affinare ed aumentare le potenzialità. Nel corso dell'ultimo decennio, le tecniche di breeding sono state tutte profondamente rivisitate grazie alle conoscenze derivanti dal sequenziamento dei genomi e dallo studio funzionale dei geni che hanno consentito lo sviluppo di marcatori molecolari ad alta processività (decine di migliaia di marcatori/reazione), la definizione di nuove tecniche di mutagenesi ed hanno spinto verso nuovi schemi di incrocio, un quadro che nell'insieme è stato definito come *next generation breeding* (Barabaschi et al., 2015).

L'Italia, anche attraverso le competenze dei ricercatori del CREA, ha contribuito a decifrare il genoma di molte specie agrarie di interesse strategico per il nostro Paese (vite, pesco, agrumi, pomodoro, frumento, carciofo, melanzana, ecc..). Oggi queste informazioni sono uno strumento importante non solo per comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'espressione di caratteri rilevanti in agricoltura, come la produttività, la resistenza a stress biotici o abiotici, la qualità delle produzioni, ma anche per sviluppare metodi innovativi e più efficienti per l'analisi della variabilità genetica e l'individuazione di marcatori molecolari utilizzabili per la caratterizzazione delle Risorse Genetiche Vegetali e la selezione assistita. Inoltre, le conoscenze relative alle sequenze dei genomi delle maggiori specie agrarie e di quelle ad esse imparentate, consentono l'isolamento dei geni alla base dei caratteri d'interesse e il loro trasferimento mirato nelle varietà coltivate (Gruskin, 2012; He et al., 2014; Varshney et al., 2014). I risultati ottenuti in tale ambito trovano naturale e logico prosieguo applicativo proprio attraverso il loro utilizzo per la realizzazione di specifici programmi di miglioramento genetico resi possibili dall'impiego di biotecnologie sostenibili di seconda generazione. L'impiego di queste biotecnologie

consente il raggiungimento di obiettivi ambiziosi in tempi relativamente brevi ed economicamente convenienti, soprattutto per le piante arboree.

In una visione più ampia, lo sviluppo di programmi di miglioramento genetico basati sulle biotecnologie di seconda generazione può consentire di:

1. sviluppare ricerca in un settore in cui l'Italia era leader;
2. capitalizzare i risultati ottenuti attraverso il sequenziamento dei genomi di molte specie importanti per il Paese;
3. costituire nuovi genotipi rispondenti alle necessità delle tante agricolture del Paese (anche per la salvaguardia delle produzioni locali e tipiche) e superare una forte dipendenza dall'approvvigionamento di materiali genetici dall'estero anche attraverso la valorizzazione della agrobiodiversità (genotipi locali).

### ***New breeding techniques ( biotecnologie sostenibili)***

Tra le nuove tecniche biotecnologiche, quelle più promettenti e per le quali vi è un notevole interesse della comunità scientifica, sono la cisgenesi e il *genome editing*. Si tratta di tecnologie di recente messa a punto che permettono di modificare in modo mirato il patrimonio genetico di una varietà commerciale, frutto spesso di numerosi anni di breeding, riproducendo quanto avviene attraverso le mutazioni naturali o l'incrocio naturale (processi che sono alla base della struttura genetica delle moderne varietà coltivate di tutte le specie agrarie), ma in maniera rapida e selettiva.

#### ***Cisgenesi***

L'approccio "cisgenico" si basa sul trasferimento nel genotipo che si intende migliorare solo di geni e sequenze regolatrici derivate da altri genotipi della stessa specie o di altre specie sessualmente compatibili. Pertanto, deve essere trasferito l'intero gene con le proprie sequenze regolatrici e nel normale orientamento; nel prodotto finale deve essere presente solo il gene che codifica per il carattere che si vuole modificare. Poiché le sequenze trasferite derivano dai genomi della stessa specie o di specie vicine, sessualmente compatibili, le conoscenze della loro sequenza, della posizione e del funzionamento nei genomi di origine sono fondamentali.

Negli ultimi anni, l'approccio cisgenico è stato utilizzato per migliorare la resistenza a patogeni in melo e patata, modificare la forma e la crescita in pioppo, ridurre il contenuto

di acido fitico in orzo, migliorare la qualità delle proteine in grano duro (Holme et al., 2013). Il gene inserito è sotto il controllo del suo promotore nativo, contiene i propri introni e la sequenza terminatrice; la cisgenesi, pertanto, esclude l'impiego di geni estranei alla specie ed i geni coinvolti sono gli stessi che verrebbero ad essere introdotti attraverso il breeding classico. Infatti, sebbene il trasferimento dei geni all'interno della stessa specie o da specie evolutivamente vicine può avvenire anche mediante le tradizionali tecniche del miglioramento genetico, basate sull'incrocio e sulla selezione dei fenotipi ricombinanti nelle progenie, l'approccio cisgenico consente di ridurre considerevolmente sia i tempi sia il trasferimento indesiderato di sequenze associate a quella "target", spesso responsabili di caratteri indesiderati. Inoltre, il genotipo e il fenotipo della varietà in cui si vuole modificare solo uno (es. resistenza a un patogeno) o pochi caratteri resta sostanzialmente inalterato, un aspetto particolarmente importante per le specie eterozigoti a propagazione vegetativa e/o a ciclo lungo, come ad es. la patata o, in genere, le specie arboree (Conner et al., 2007; Holme et al., 2013; Hou et al., 2014) nelle quali le varietà commerciali sono il risultato di numerosi anni di valutazione e selezione.

### **Genome editing**

Per "genome editing" (modificazione, correzione del genoma cioè del corredo genetico di ogni organismo vivente) si intende l'insieme di quelle tecniche che consentono di modificare, eliminare, sostituire o inserire, in maniera mirata, specifiche sequenze genomiche (geni) d'interesse. Tralasciando in questa sede i dettagli tecnici, esse si basano sull'induzione di tagli nel doppio filamento di DNA, che vengono poi "riparati" con due processi alternativi: a) il *Non homologous end-joining (NHEJ)* o b) l'*Homology-directed repair (HDR)*. I due processi di "riparazione" hanno effetti, e, quindi, utilizzazioni differenti (Puchta and Fauser, 2014; Rinaldo and Ayliffe, 2015).

Mediante l'uso di sistemi diversi (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9), i tagli nel doppio filamento di DNA possono essere indotti in regioni pre-selezionate del genoma della pianta attraverso l'uso di specifiche nucleasi. Dopo che i due filamenti della doppia elica del DNA sono stati tagliati, la cellula mette in moto dei meccanismi di riparazione. In assenza di altre sequenze, i filamenti si ricongiungono mediante NHEJ, ma, poiché questo processo è suscettibile di errori, vengono indotti dei piccoli cambiamenti (mutazioni) nella sequenza originale che, generalmente, possono determinare la perdita o la modifica della funzionalità del gene e, pertanto, la formazione di un fenotipo mutato. Questo risultato è

simile a quello ottenibile con altre tecnologie da tempo in uso, come la mutagenesi con mutageni chimici o fisici, ma l'induzione di mutazioni non è casuale in tutto il genoma, come nella mutagenesi classica, bensì limitata a brevi tratti (poche basi) entro il gene d'interesse.

Se insieme alle nucleasi summenzionate vengono inserite nella cellula anche delle opportune sequenze di DNA, queste possono, utilizzando il meccanismo della ricombinazione omologa (HDR), che al contrario dell'NHEJ non induce errori, sostituire (correggere) alcuni frammenti della sequenza all'interno del gene che si vuole modificare oppure aggiungere dei nuovi geni in una posizione predeterminata del genoma.

Attualmente diversi laboratori di ricerca nel mondo, tra cui alcuni in Italia, stanno lavorando per migliorare l'efficienza e la precisione delle tecnologie succitate (Fichtner et al., 2014). Sono stati già ottenuti risultati di rilievo non solo in piante modello, ma anche in diverse specie d'interesse agrario, quali riso, grano, mais, patata ed altre (Tabella 1) per la resistenza ai patogeni e per il miglioramento della qualità dei prodotti (Brooks et al., 2014; Char et al., 2015; Clasen et al., 2015; Lor et al., 2014; Nicolìa et al., 2015; Osakabe and Osakabe, 2014; Rinaldo and Ayliffe, 2015; Shan et al., 2015).

I genotipi ottenuti attraverso queste tecniche sono spesso considerati come *border line* tra piante GM e piante tradizionali (Araki e Ishii, 2015), in quanto richiedono per la loro genesi un evento iniziale di trasformazione genetica che può però essere interamente rimosso senza lasciare tracce una volta ottenuta la modificazione desiderata.

Nel complesso si ritiene che:

- le tecniche di cisgenesi e *genome editing*, nelle specie vegetali di interesse agrario ed alimentare, per le quali esiste una completa conoscenza dei genomi e della funzione dei geni responsabili, consentono di indurre precisi cambiamenti nel genoma aggiungendo, rimuovendo o sostituendo brevi tratti di DNA (una o poche basi) in specifici siti;
- i rischi e i benefici dei nuovi genotipi costituiti, sono determinati dai cambiamenti introdotti e non dal metodo utilizzato per realizzarli;
- diversamente dalla mutagenesi indotta dalle radiazioni chimiche o fisiche, spesso utilizzate quale strumento per il miglioramento genetico, le nuove tecniche sono meno invasive e senza effetti collaterali, non determinando

infatti mutazioni off-target sconosciute e indesiderate all'interno del genoma. A differenza delle colture GM, molte delle “*new breeding techniques*” non comportano l'inserimento di DNA estraneo nel prodotto finale;

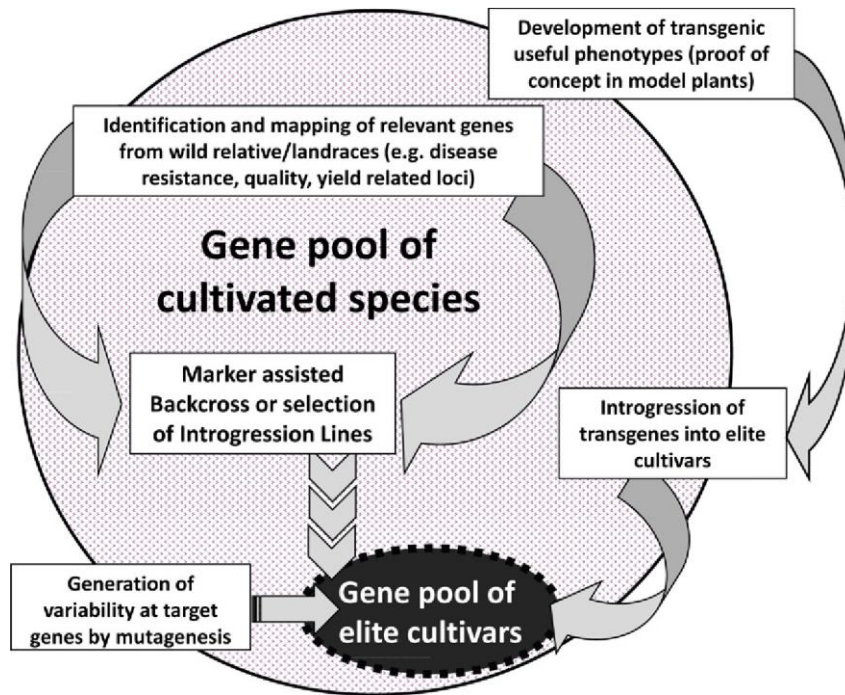
- in diversi casi il prodotto delle nuove tecnologie non è distinguibile da un identico prodotto ottenibile attraverso tecniche di miglioramento genetico convenzionale, che, necessiterebbero, comunque di tempi molto più lunghi e con probabilità di successo notevolmente inferiori.

### **Regolamentazione e possibili innovazioni**

Allo stato attuale delle conoscenze e del dibattito non vi è certezza se le biotecnologie di seconda generazione tra cui la cisgenesi e il *genome editing* rientrano all'interno dell'attuale legislazione europea per le colture OGM.

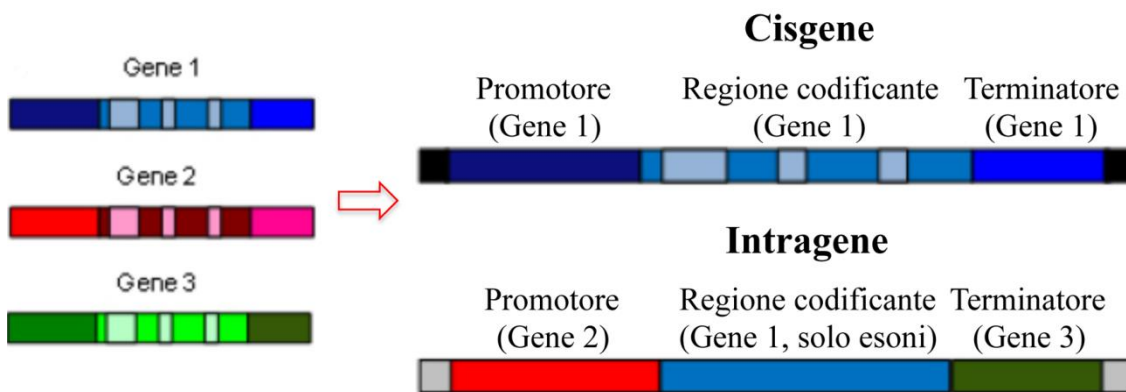
Bisogna, tuttavia, segnalare che diversi documenti redatti da organizzazioni scientifiche europee indicano che i prodotti di tali tecniche non rientrano nella casistica OGM dal momento che essi non sono diversi da quelli ottenibili attraverso un miglioramento genetico convenzionale. Gli Stati Uniti hanno ad esempio già dichiarato che le piante ottenute attraverso il genome editing non sono da considerare OGM (Jones, 2015) ed è già stato redatto un parere dell'EFSA (European Food Safety Authority) nel 2012 su richiesta dell'UE in cui si conclude che le piante ottenute per cisgenesi non presentano differenze in termini di pericolosità rispetto a quelle costituite attraverso un normale processo di incrocio.

Documenti redatti dall'EASAC (European academies of Science advisory council) nel luglio 2015, così come quelli prodotti da ACRE (UK Advisory Committee on Release to the Environment) nel 2013 espongono fermamente all'UE di non ricomprendere i prodotti delle biotecnologie di seconda generazione tra quelli inclusi nella legislazione OGM, quando gli stessi non contengono DNA estraneo alla specie vegetale oggetto dell'intervento di miglioramento genetico.

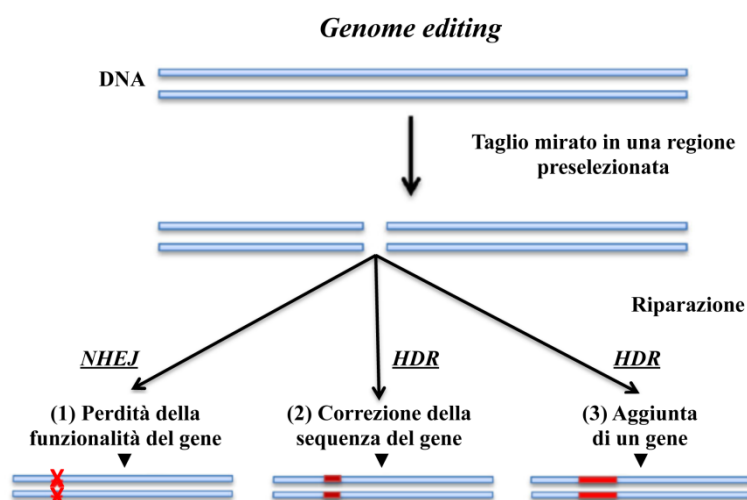


Schema dei moderni approcci nel miglioramento genetico. I geni di interesse, agronomicamente utili, presenti nel gene pool delle specie coltivate vengono progressivamente accumulati attraverso il miglioramento genetico nelle cultivar commerciali. (da Borrelli et al., 2015).

### Geni da specie sessualmente compatibili



La trasformazione genetica mediante **cisgenesi** o **intragenesi** prevede il trasferimento di geni e sequenze regolatrici (es. promotore e terminatore) da specie sessualmente compatibili. Con la cisgenesi si trasferisce il gene esattamente come è presente nella specie donatrice, mentre con l'intragenesi si possono assemblare sequenze provenienti da più geni. Modificata da Holme et al. (2013).



Negli approcci di **Genome editing** diverse tecnologie (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) possono essere oggi utilizzate per la formazione di tagli nel doppio filamento di DNA in una regione preselezionata del genoma. La riparazione dei tagli con il meccanismo *Non homologous end-joining* (NHEJ) induce errori e provoca la perdita di funzionalità di un gene bersaglio (1), mentre con il meccanismo *Homology-directed repair* (HDR) si può decidere di sostituire (correggere) alcuni frammenti di un gene (2) o aggiungere/sostituire un intero gene (3). Modificata da Chen and Gao (2014).

Esempi di caratteri migliorati mediante metodologie di *genome editing*<sup>a</sup>.

Specie	Carattere
Arancio dolce	n.d. <sup>b</sup>
Grano tenero	Resistenza a oidio ( <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> )
Mais	Contenuto di acido fitico Composizione endosperma Tolleranza a erbicidi / Contenuto di acido fitico
Patata	Ridotto accumulo di zuccheri riduttori durante la conservazione a basse temperature; contenuto di acrilamide in seguito a frittura Biosintesi degli aminoacidi
Pomodoro	Crescita della pianta Morfologia delle foglie
Riso	Resistenza a maculatura batterica ( <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> )
Soia	Composizione degli acidi grassi nei semi

<sup>a</sup> (Brooks et al., 2014; Char et al., 2015; Clasen et al., 2015; Lor et al., 2014; Nicolia et al., 2015; Osakabe and Osakabe, 2014; Rinaldo and Ayliffe, 2015; Shan et al., 2015)

<sup>b</sup> n.d. = non definito