



Le applicazioni biotecnologiche per una viticoltura sostenibile

Dr. Riccardo Velasco



....e nelle resistenze genetiche...

Acquisizione di nuovo Materiale Genetico (già in collezione e nuove viti americane, 2011)

Attività in corso presso FEM, M.Stefanini e S.Vezzulli

Recupero/raccolta di ibridi, loro genotipi parentali e putativi ancestrali che sono potenziali donatori di resistenze a DM e PM.

Totale di **264** accessioni studiate:

- 120 ibridi di origine americana (incluse acc. selvatiche – NJ, USA)
- 100 ibridi di origine europea (incluse acc. da altri programmi di breeding)
- 44 varietà di V. vinifera (le più impiegate nei programmi di breeding e presenti nei pedigree degli ibridi studiati)



Fenotipizzazione per le Resistenze

Fenotipizzazione di 100 accessioni presenti a FEM per la resistenza a Peronospora (su piante in vaso e dischetti fogliari) e a Oidio (su piante in vaso) – almeno due repliche.

(*Vezzulli et al.*, submitted to EJPP)



Sintomi di Peronospora (DM)

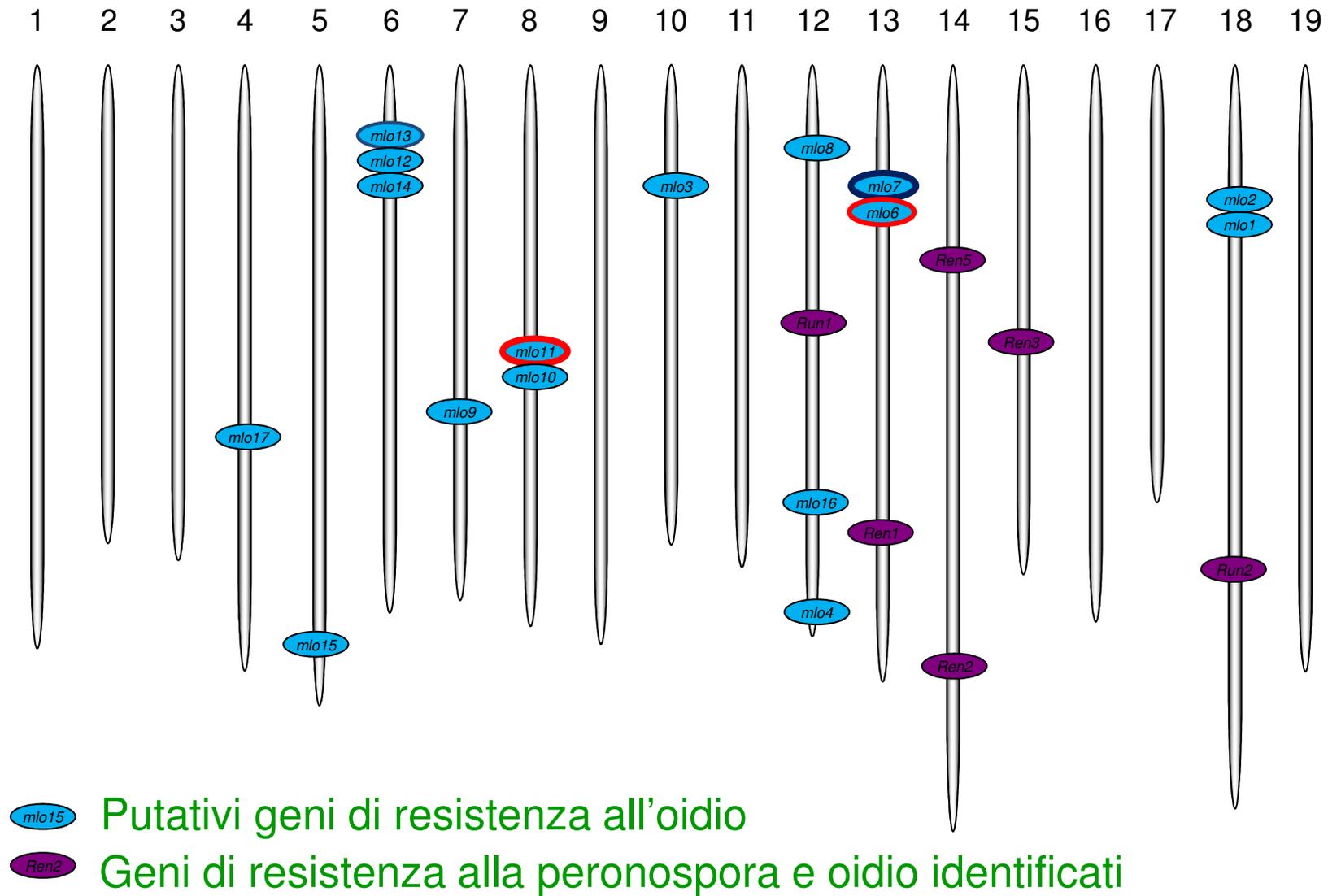
(*Plasmopara viticola*)

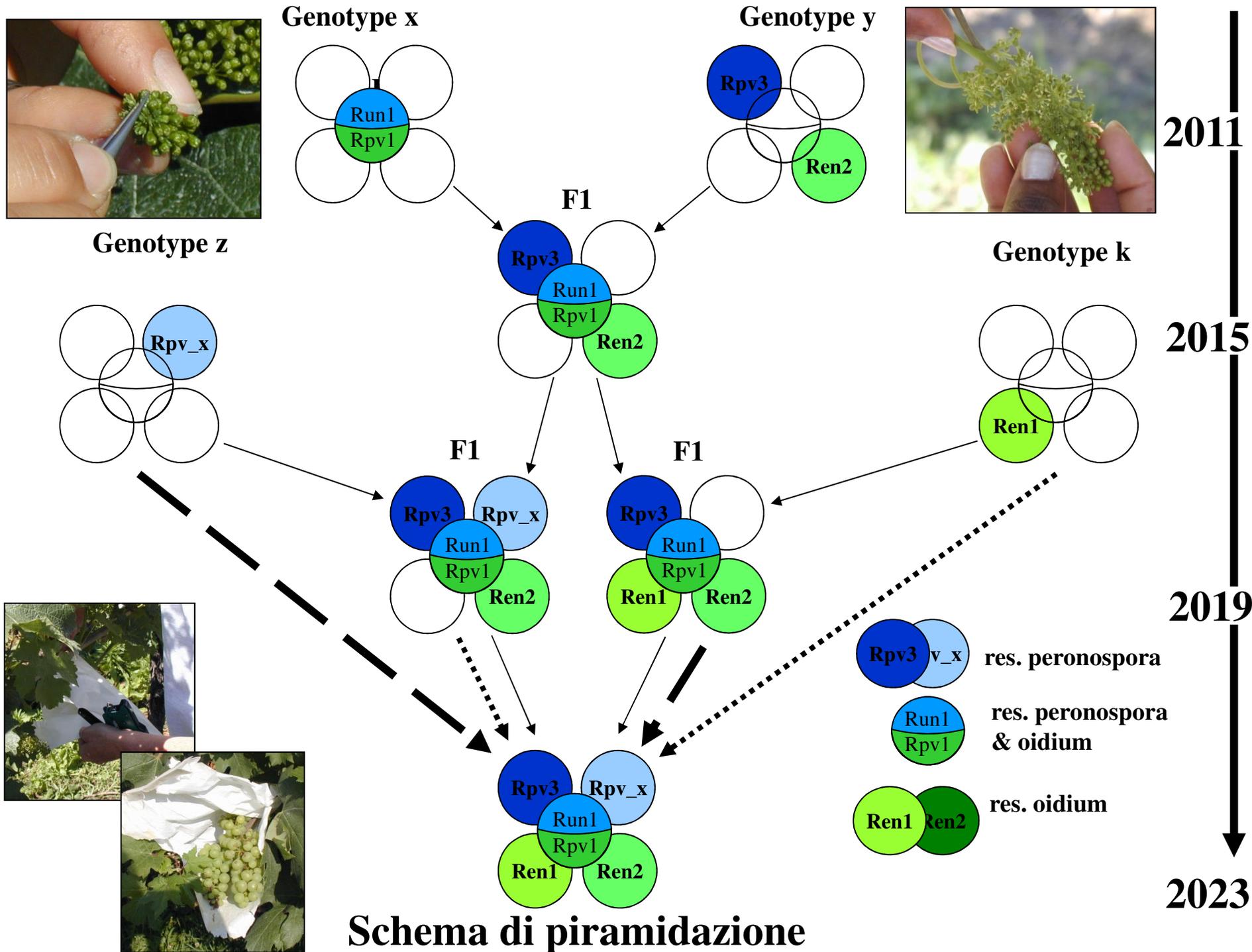


Sintomi di Oidio (PM)

(*Oidium tuckeri*)

Dal genoma della vite: identificazione di geni di resistenza



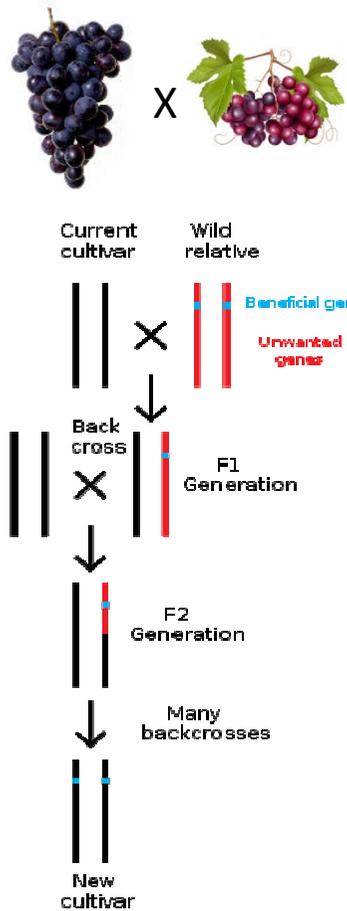




***Modificare le varietà esistenti:
È possibile senza produrre OGM?***



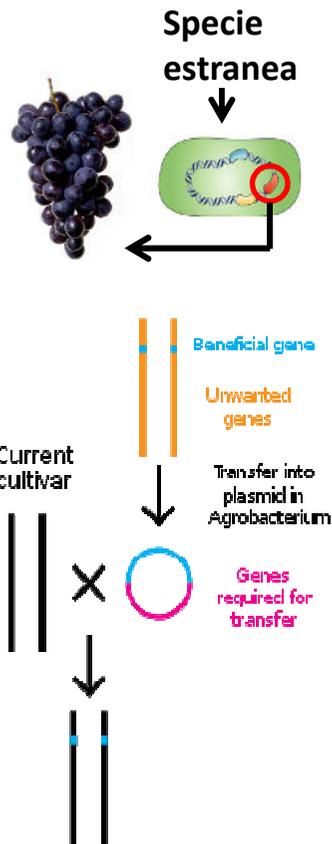
Incrocio Convenzionale



12-15 anni

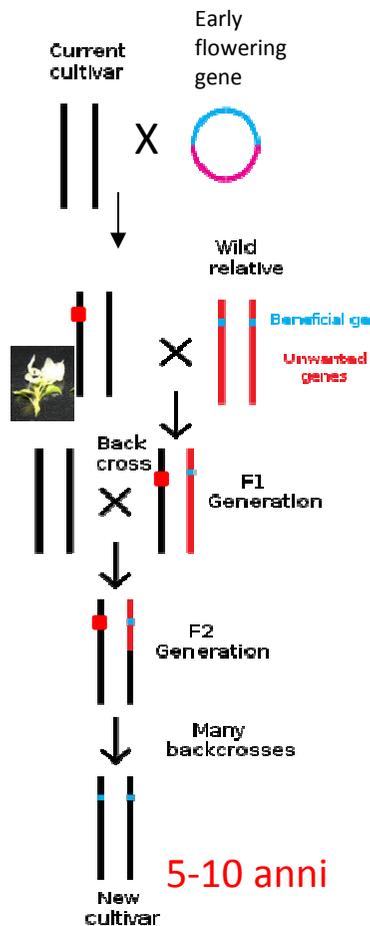
Modifica Genetica

Trangenesi



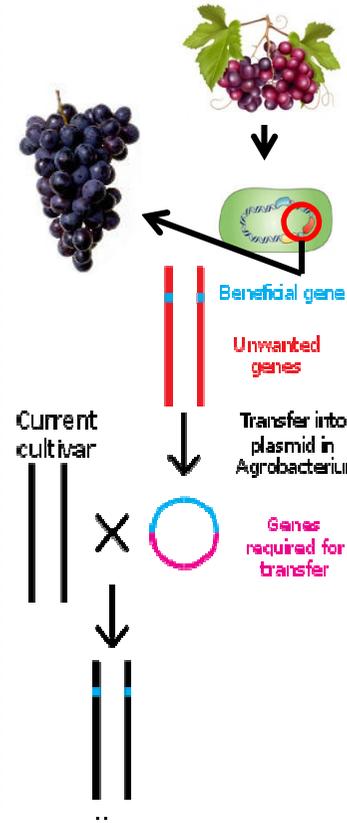
3 anni

Fast Breeding (processo transgenico)



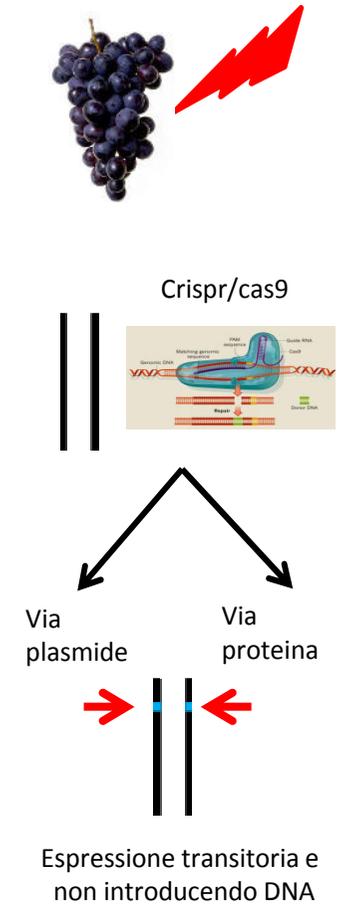
5-10 anni

Cisgenesisi



3 anni

Genome Editing (mutagenesi)

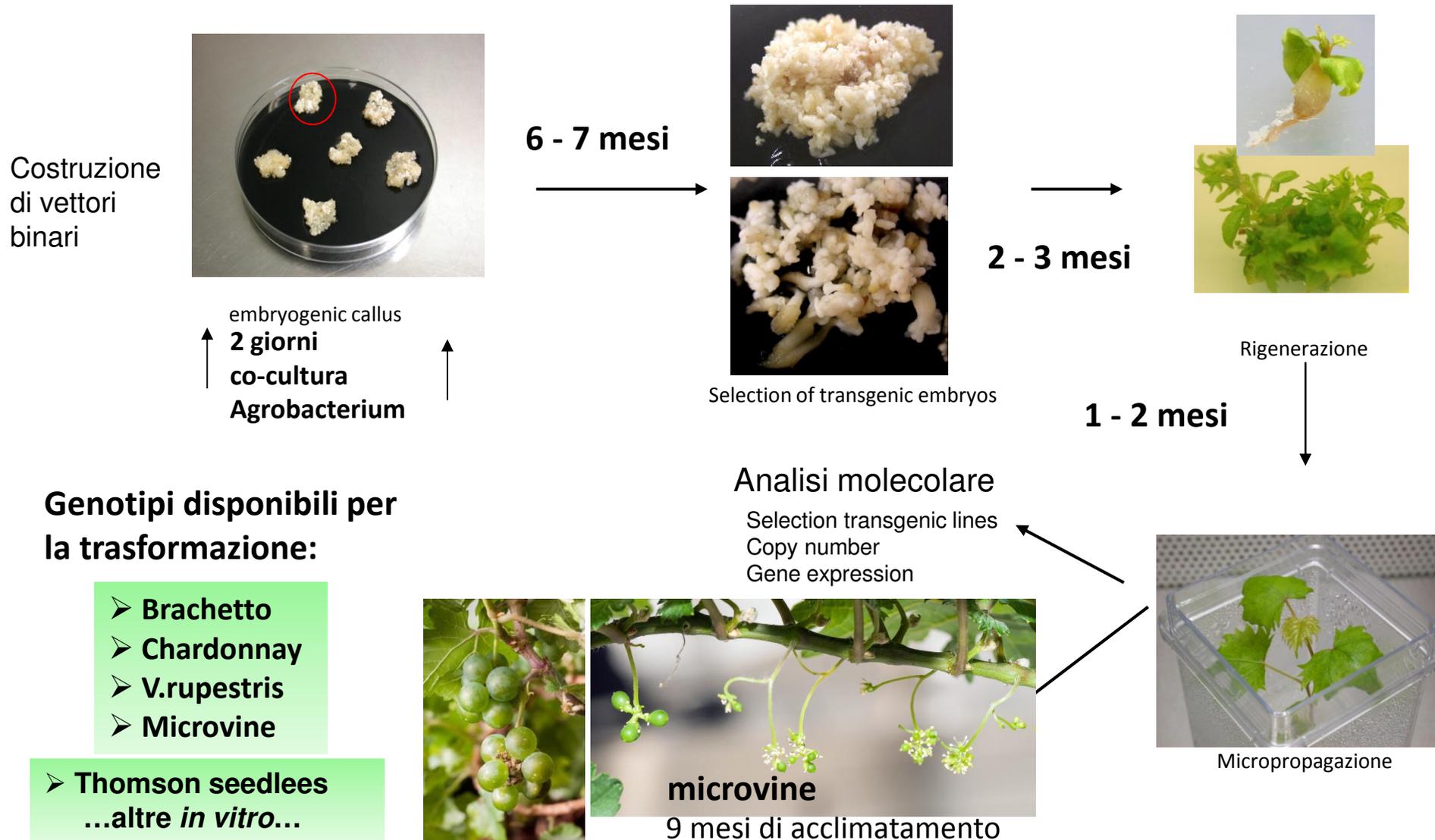
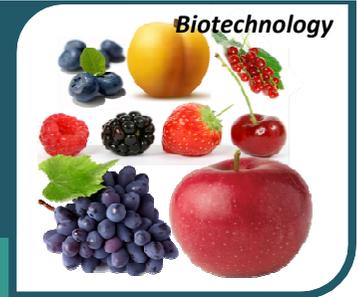


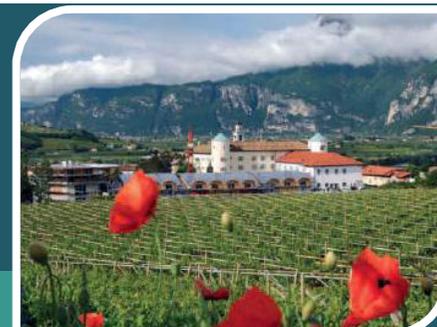
3 anni

Piattaforma biotecnologie

servizi

Center of Research & Innovation





Riguardo agli organismi geneticamente modificati la Direttiva 2001/18/EC recita all'articolo 2:

«organismo geneticamente modificato (OGM)», un organismo, diverso da un essere umano, il cui **materiale genetico è stato modificato in modo diverso da quanto avviene in natura** con l'accoppiamento e/o la ricombinazione genetica naturale. Ai fini della presente definizione:

a) una modificazione genetica è ottenuta almeno mediante l'impiego delle tecniche elencate nell'allegato I A, parte 1;

...

Il successivo Articolo 3 specifica delle deroghe:

Deroghe

1. La presente direttiva non si applica agli organismi ottenuti con le tecniche di modificazione genetica di cui all'allegato I B.

...

Dip. di Genomica e Biologia delle Piante da Frutto

Center of Research & Innovation



Allegato 1A

TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 2, PARAGRAFO 2
PARTE 1

Le tecniche di modificazione genetica di cui all'articolo 2, paragrafo 2, lettera a), comprendono tra l'altro:

- 1) tecniche di ricombinazione dell'acido nucleico che comportano la formazione di nuove combinazioni di materiale genetico mediante inserimento in un virus, un plasmide batterico o qualsiasi altro vettore, di molecole di acido nucleico prodotte con qualsiasi mezzo all'esterno di un organismo, nonché la loro incorporazione in un organismo ospite nel quale non compaiono per natura, ma nel quale possono replicarsi in maniera continua;
- 2) tecniche che comportano l'introduzione diretta in un organismo di materiale ereditabile preparato al suo esterno, tra cui la microiniezione, la macroiniezione e il microincapsulamento;
- 3) fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) o tecniche di ibridazione per la costruzione di cellule vive, che presentano nuove combinazioni di materiale genetico ereditabile, mediante la fusione di due o più cellule, utilizzando metodi non naturali (non-sessualmente compatibili).

.....

Allegato I B

TECNICHE DI CUI ALL'ARTICOLO 3

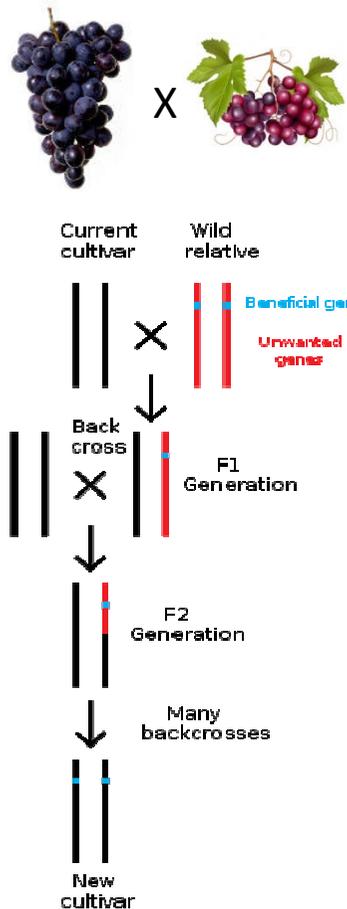
Le tecniche o i metodi di modificazione genetica che implicano l'esclusione degli organismi dal campo di applicazione della presente direttiva, a condizione che non comportino l'impiego di molecole di acido nucleico ricombinante o di organismi geneticamente modificati diversi da quelli prodotti mediante una o più tecniche oppure uno o più metodi elencati qui di seguito sono:

1. la mutagenesi;
2. la fusione cellulare (inclusa la fusione di protoplasti) di cellule vegetali di organismi che possono scambiare materiale genetico anche con metodi di riproduzione tradizionali (sessualmente compatibili).

Sono OGM

NON-Sono OGM

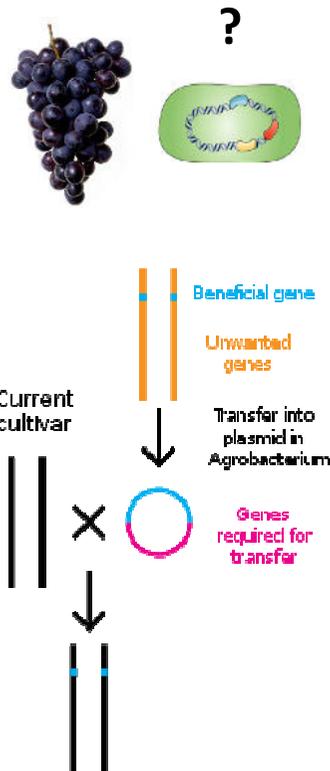
**Incrocio
Convenzionale**



Modifica Genetica

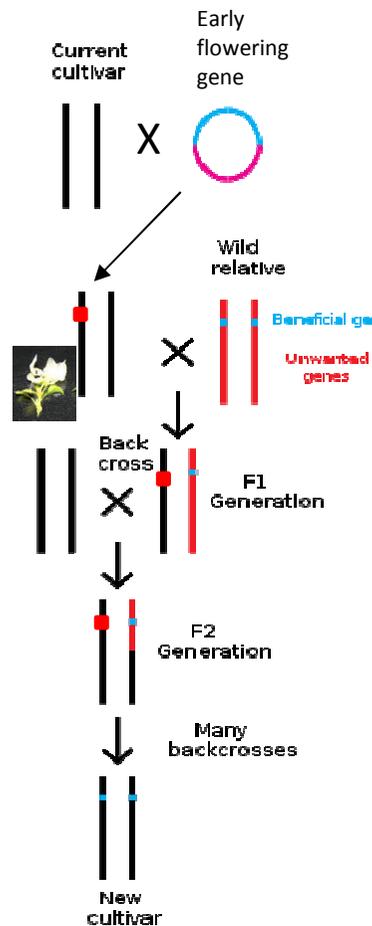
OGM

Trangenesi



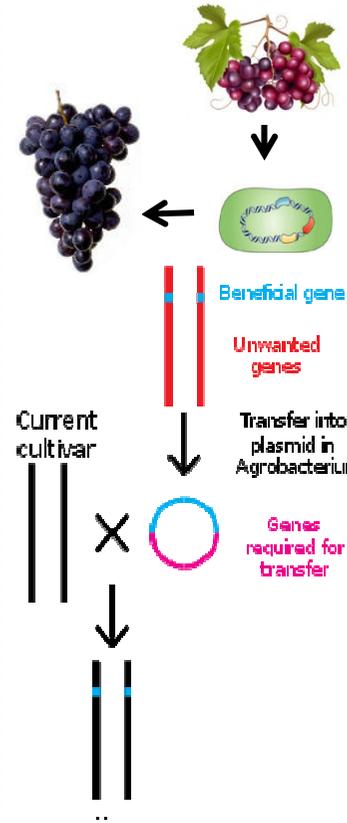
OGM

**Fast Breeding
(processo transgenico)**



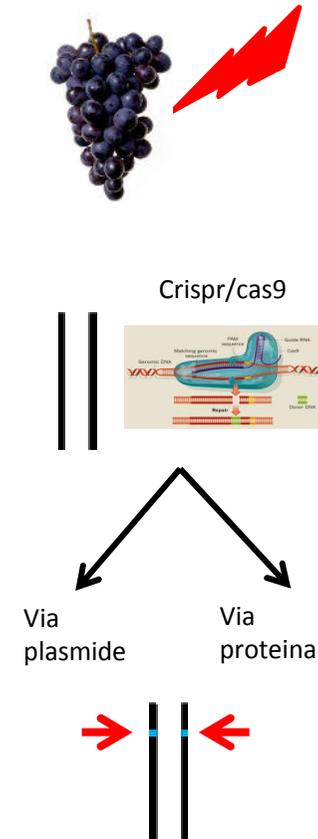
OGM(?)

Cisgenesis



**EU 18/2001:
Mutagenesi
Non è OGM**

**Genome Editing
Non OGM (?)**

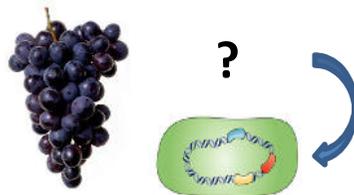




In base all'origine del DNA che può essere trasferito si distinguono però diversi prodotti:

- **DNA transgenico**, quando il DNA trasferito appartiene a una specie che **non può** essere **incrociata** (sessualmente incompatibile) con l'organismo ricevente;

transgenesi



cisgenesi



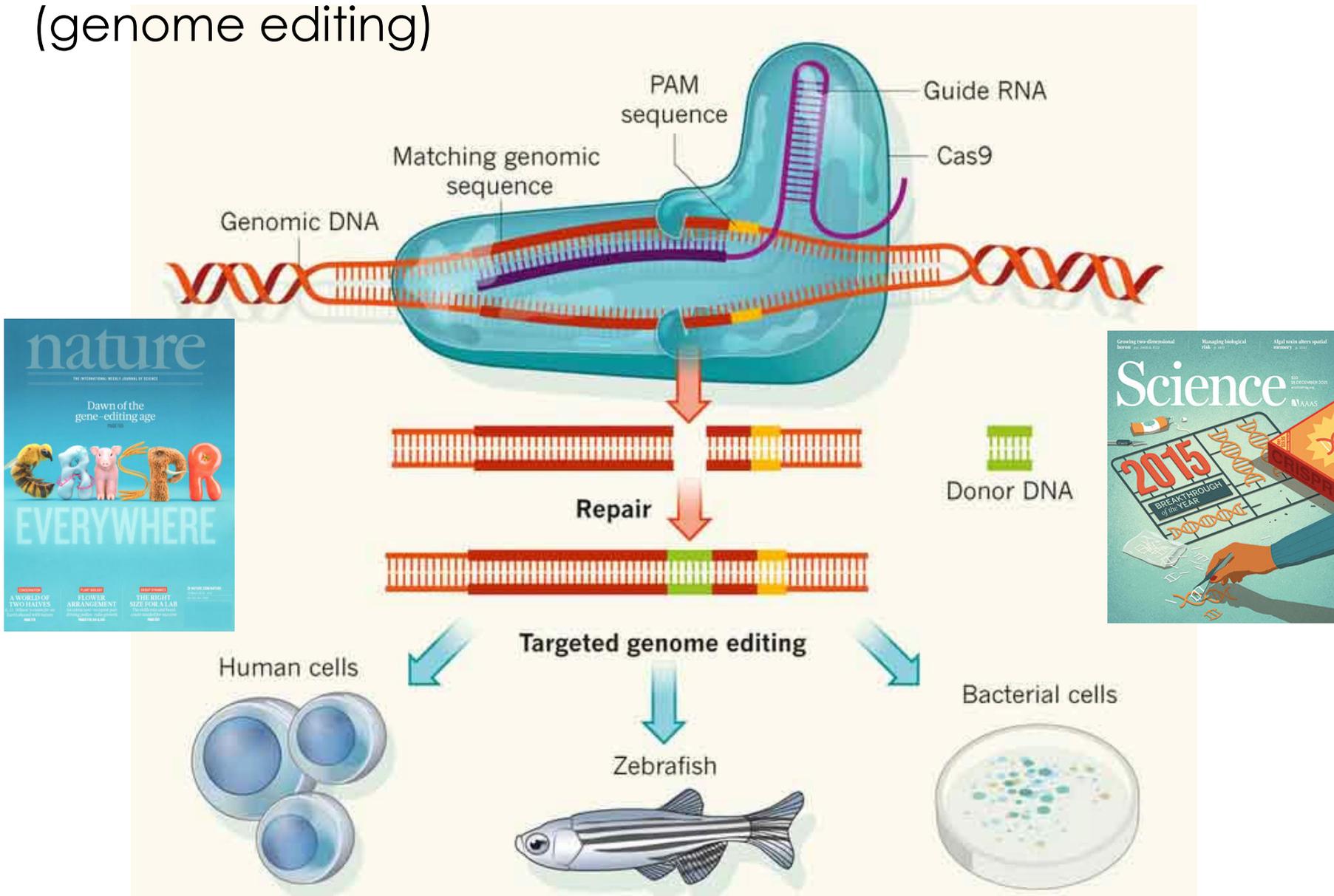
- **DNA cisgenico**, quando **tutta la sequenza del DNA** appartiene alla specie ricevente o ad una affine sessualmente, **sia nella sequenza codificante che in quella regolatrice**.



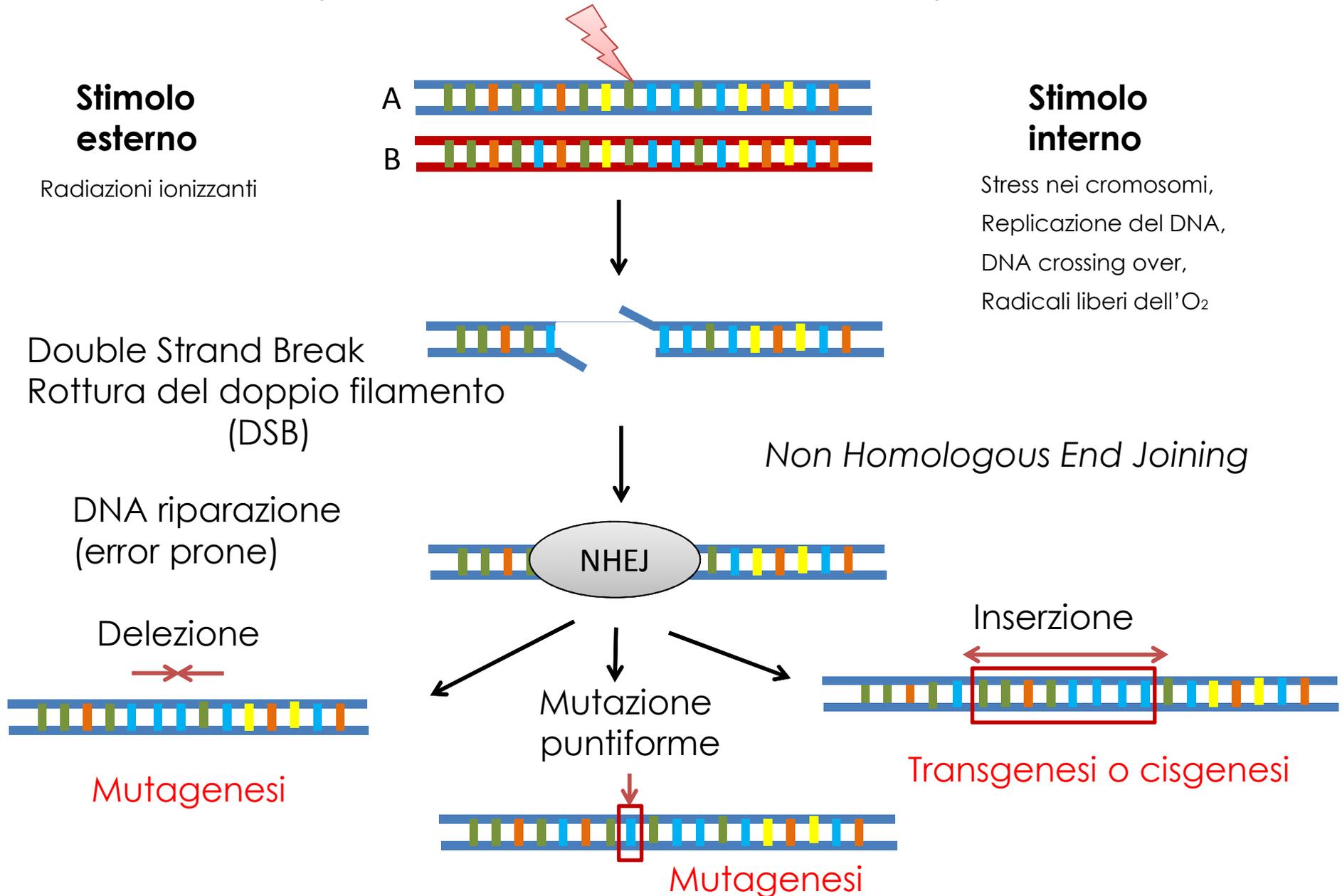
Il genome editing: le tre vie



La proteina CRISPR/Cas9: la rivoluzione biotecnologica (genome editing)



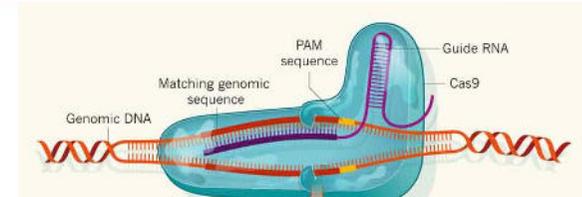
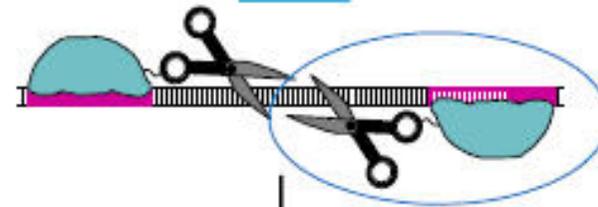
Meccanismi di riparazione del DNA **naturalmente** presenti nella cellula



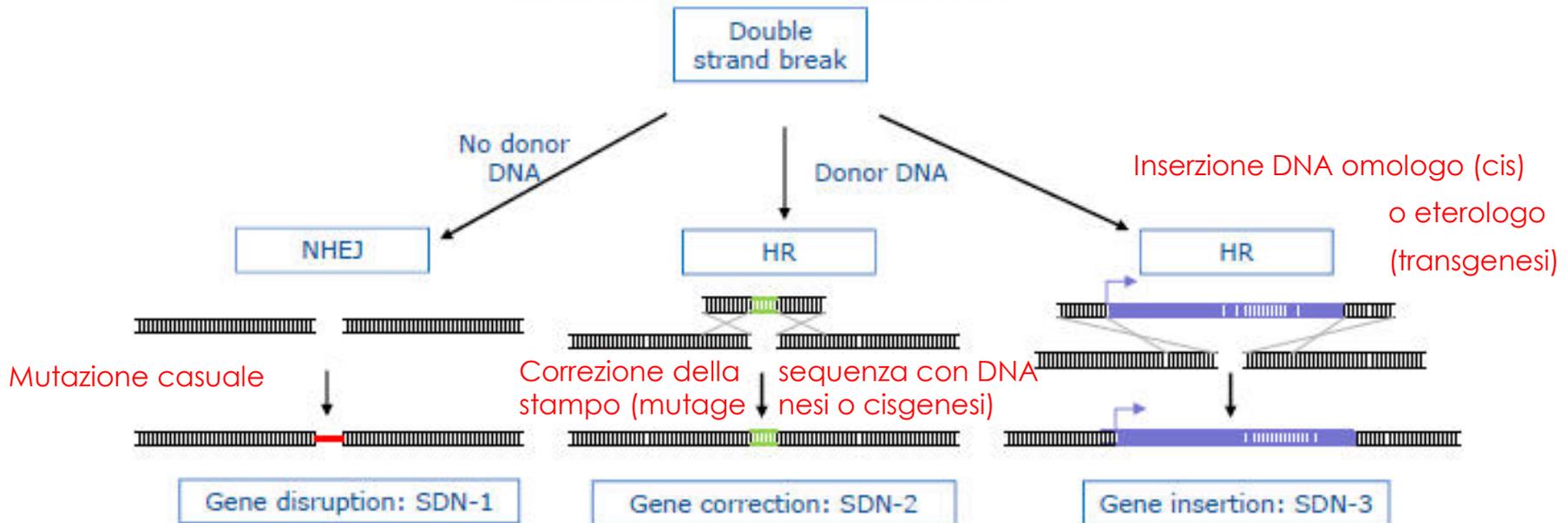
SDN TECHNIQUES



LE NUCLEASI SITO DIRETTE



Mutagenesi biologica
Indotta mirata
specifica per un gene

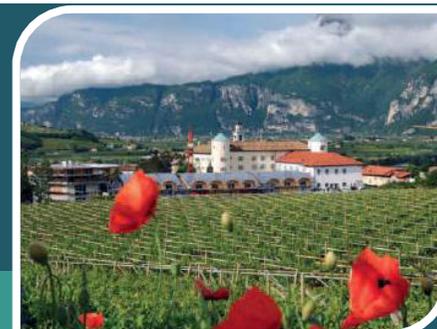


Ingegnerizzando il genoma, è possibile prima determinare la sequenza del DNA e la modifica desiderata nella varietà coltivata e poi introdurre la variante genetica nel sito desiderato precisamente e rapidamente.



Mutagenesi fisica, chimica e ...biologica





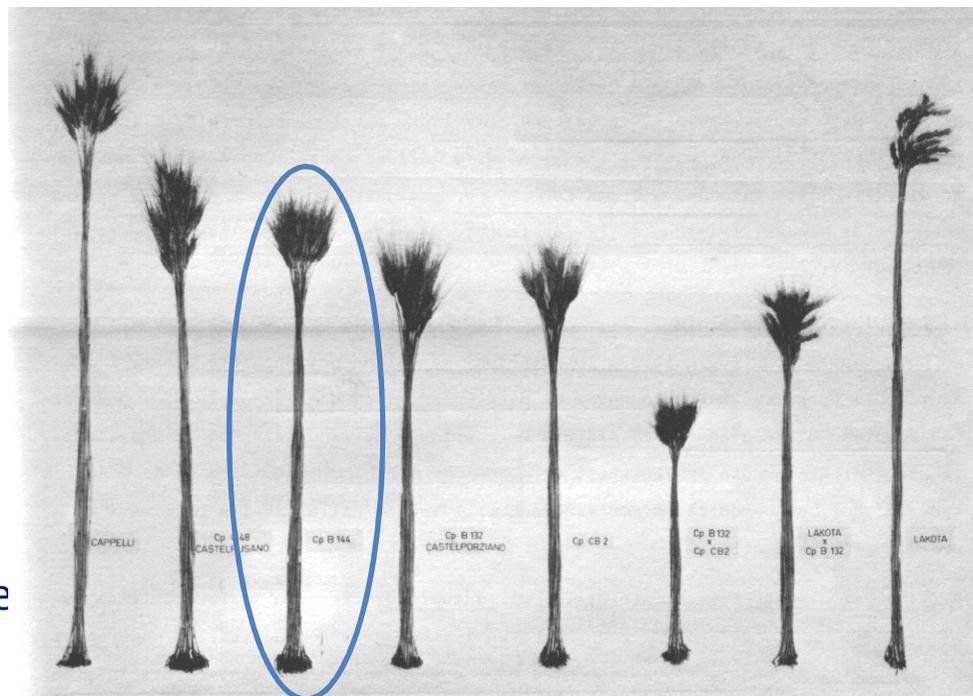
Mutagenesi chimica o fisica

L'esplorazione della **variabilità genetica**, frutto di continue mutazioni del DNA di una specie e del loro accumulo nei milioni di anni della loro evoluzione, è stata alla base della rivoluzione verde che dagli anni cinquanta ha caratterizzato l'aumento di quantità e qualità delle produzioni.

Questo incremento è in parte fondato sull'utilizzo di **mutageni chimici e fisici (raggio ionizzanti)** ed il conseguente incremento della variabilità genetica (biodiversità)

Alcuni importanti mutanti di frumento duro prodotti in Italia mediante mutagenesi con **radiazioni ionizzanti**.

Il **CP B144** è stato utilizzato per ottenere il **Creso** (fonte ENEA)



Varietà mutate ottenute in numerose specie di uso agricolo: il CRESO

Il **CRESO** proviene dall'incrocio di un frumento duro del CIMMYT con una linea mutante (**Cp B144**) indotta da una **irradiazione combinata di neutroni e raggi gamma** nel frumento duro Cappelli, entrambi a paglia corta, e ottenuto da Alessandro Bozzini e Carlo Mosconi all'interno del gruppo di genetisti del Centro della Casaccia dell'ENEA (Bagnara, D'Amato, Rossi, Scarascia Mugnozza ed altri).

La sua principale caratteristica è quella di avere una taglia ridotta (70-80 centimetri) rispetto ai frumenti duri esistenti all'epoca (130-150 cm), che ha reso la cultivar molto resistente all'allettamento.

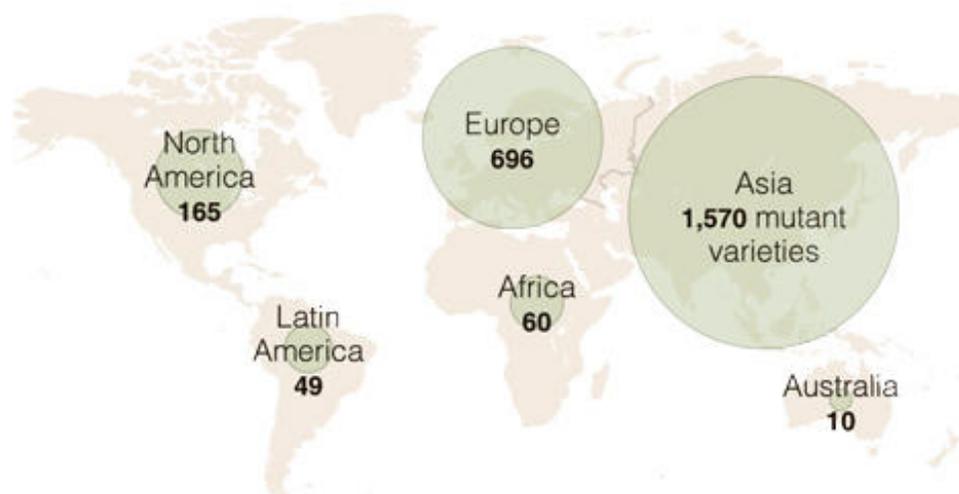
Iscritto al registro delle varietà nel 1974, **CRESO** ebbe immediata e ampia diffusione e negli anni '80 e '90 ha rappresentato oltre il 50% della produzione di frumento duro in Italia

È stato utilizzato ampiamente in tutto in programmi di miglioramento genetico in tutto il mondo dalla Cina all'Australia, all'Argentina, agli USA, al Canada e presso i grandi Centri di Ricerca Internazionali (CIMMYT, ICARDA, CSIRO, ecc.)

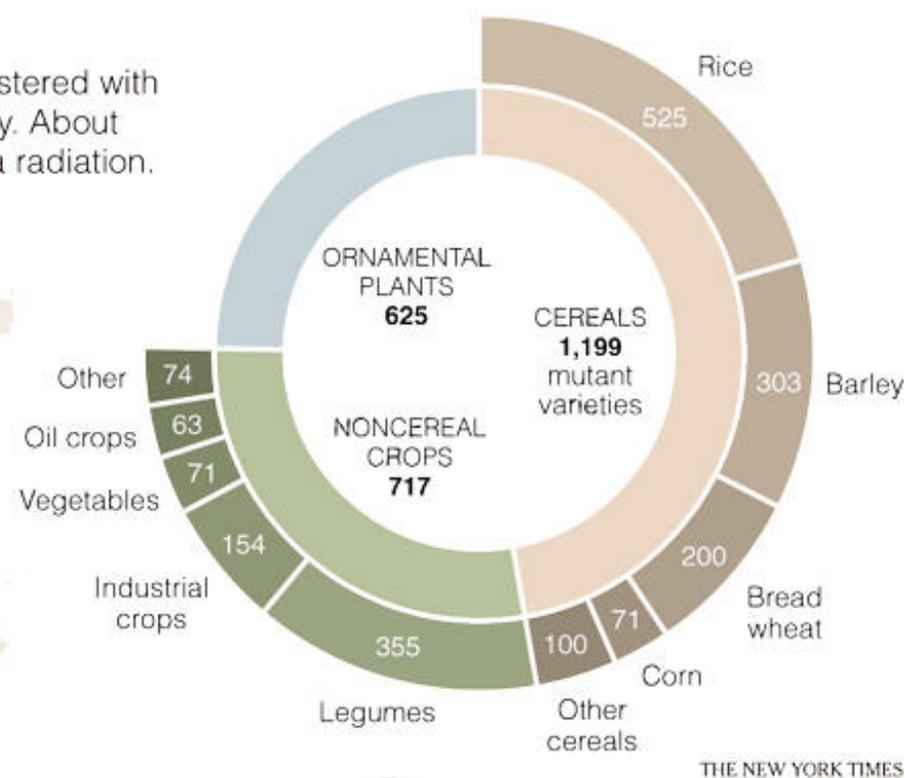
Varietà mutate ottenute in numerose specie di uso agricolo: **2500 varietà coltivate di cereali, industriali e ornamentali**

Here to Stay

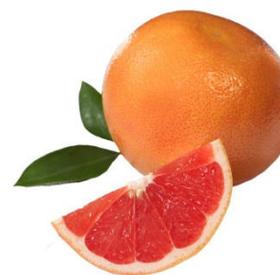
More than 2,500 mutant crop varieties have been officially registered with the United Nations and the International Atomic Energy Agency. About three-quarters of the varieties were directly induced by gamma radiation.



Source: F.A.O./I.A.E.A. Mutant Variety Database



Il pompelmo rosa
È un agrume ottenuto per mutagenesi





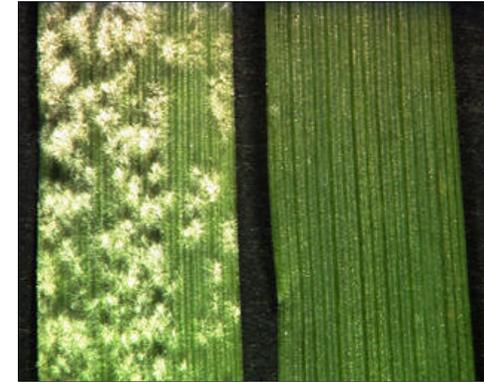
Resistenza vs. suscettibilità



Resistenza e suscettibilità. Oidio in orzo

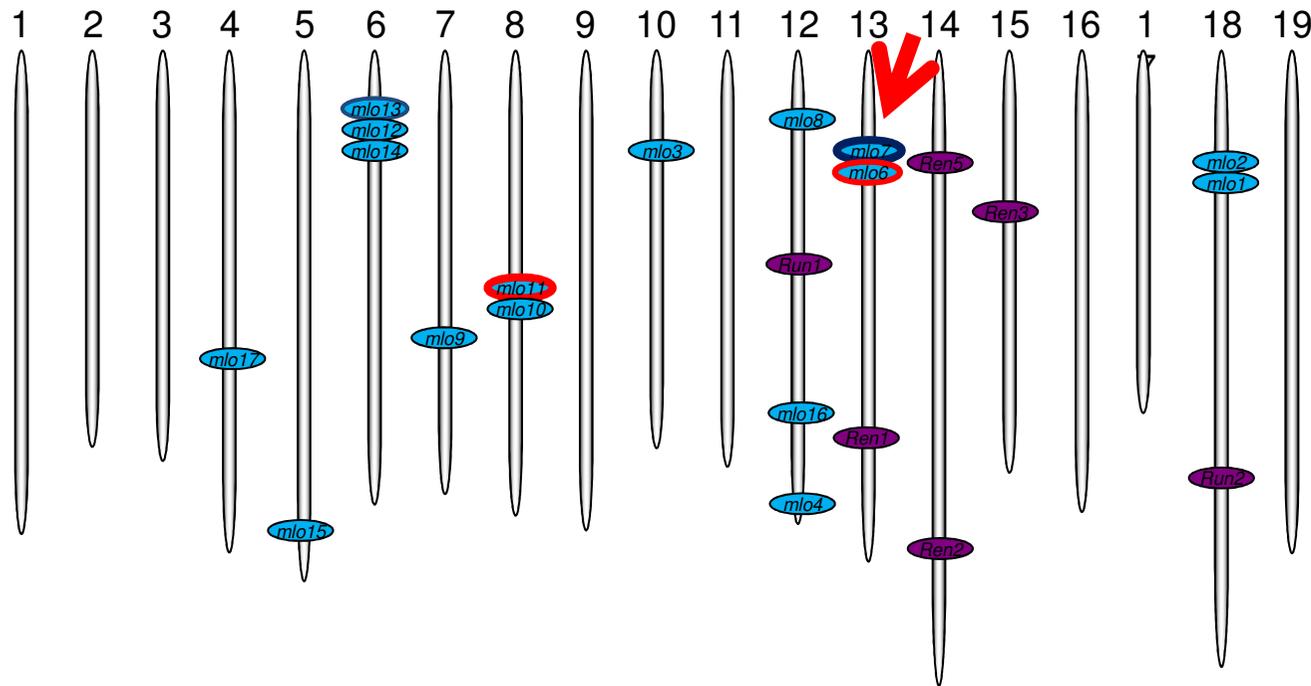
Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G.,
 Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T.,
 Diergaarde, P., Gronendijk, J., Töpsch, S., Vos, P., Salamini, F.,
 Schulze-Lefert, P. (1997)

The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant
 pathogen resistance. Cell 88: 695-705



Orzo *Mlo* vs. *mlo*

Mlo gene family in grapevine – distribution along the 19 chromosomes



Brachetto vite suscettibile



Brachetto-*mlo07* mutato

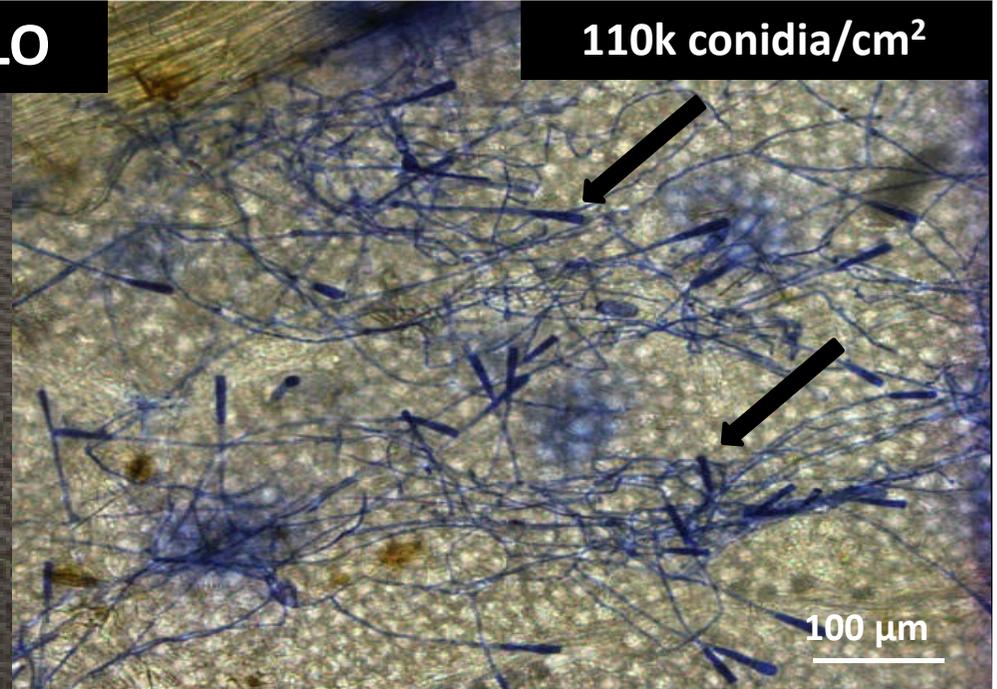
Geni *mlo*-like in vite, esiste funzione simile come in orzo?

Severity: 23.7%



MLO

110k conidia/cm²

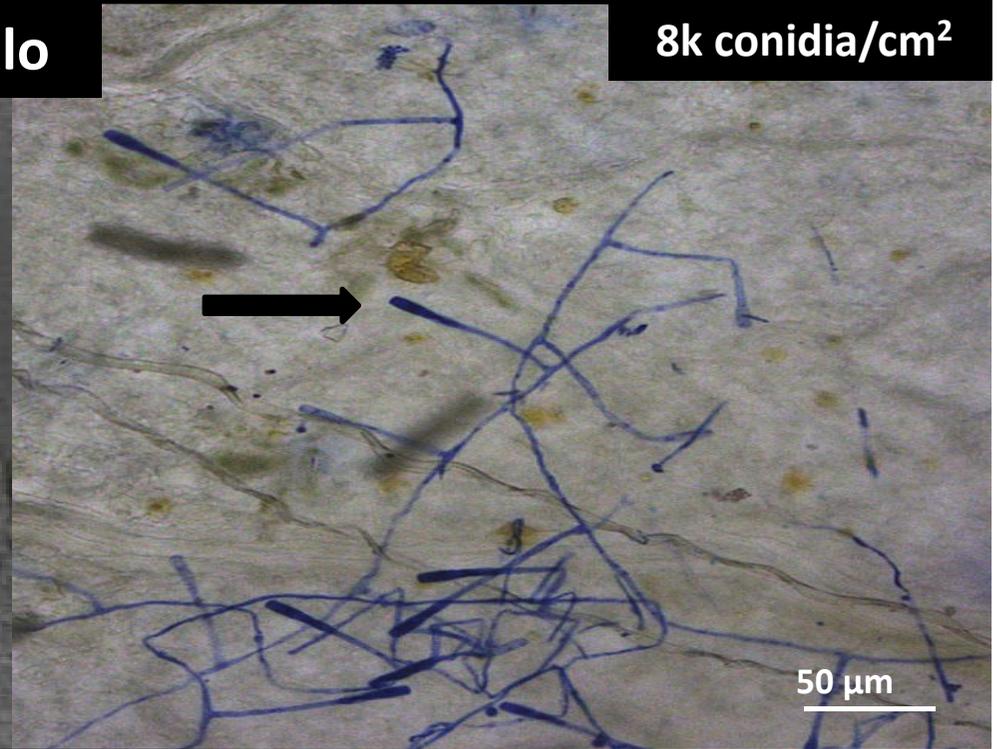


Severity: 6.4%



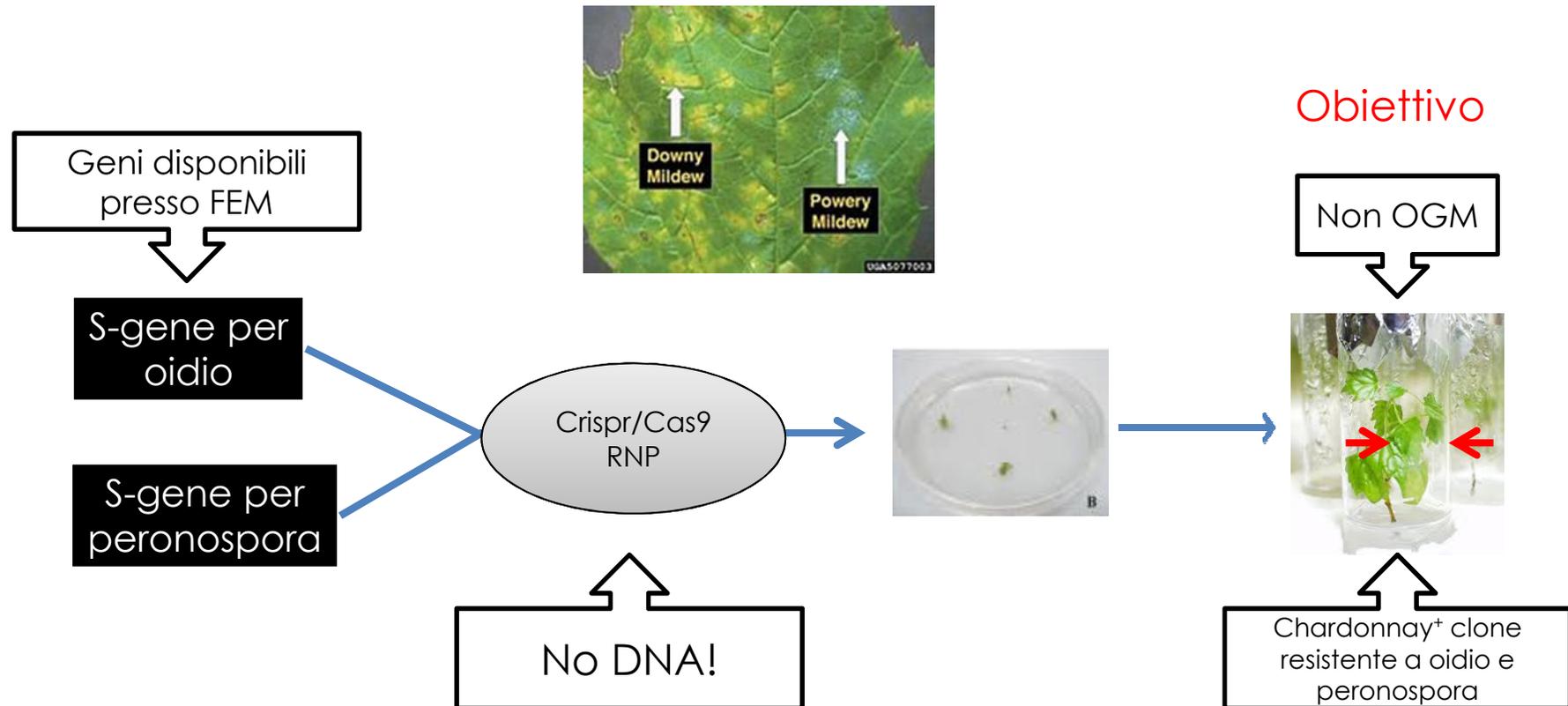
mlo

8k conidia/cm²



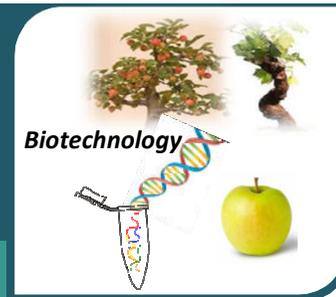
Progetto Chardonnay⁺ (con due ditte private)

- 76.000 tonnellate di fungicidi sono usati annualmente in vite in Europa
- 53.000 tonnellate (76%) per una spesa di circa €164m per anno.
- Nonostante i trattamenti diffusi si ha comunque una perdita del 2% di prodotto in Europa per anno (300M €)

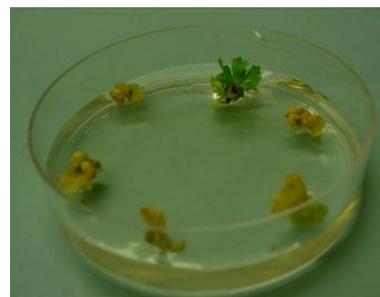
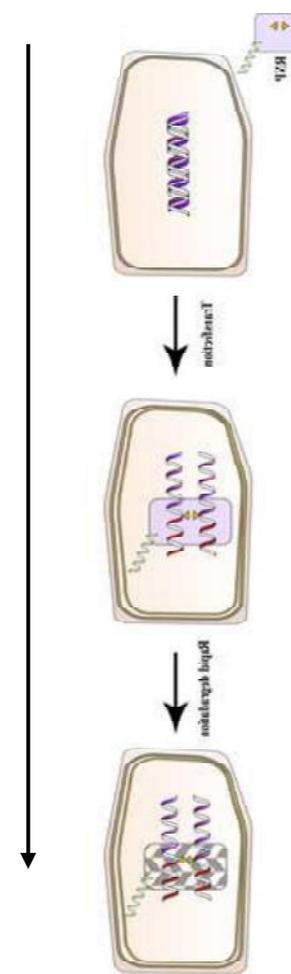
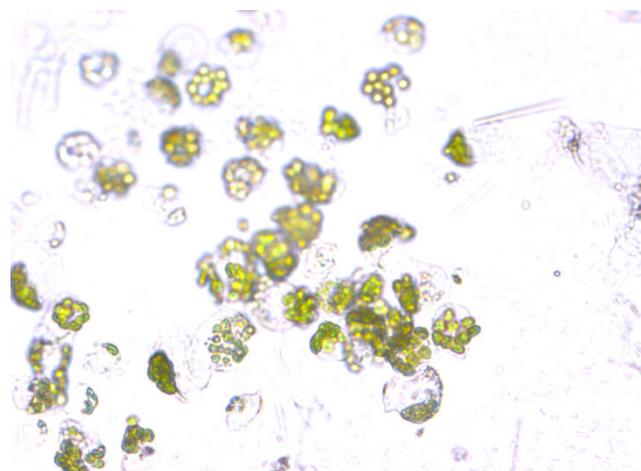
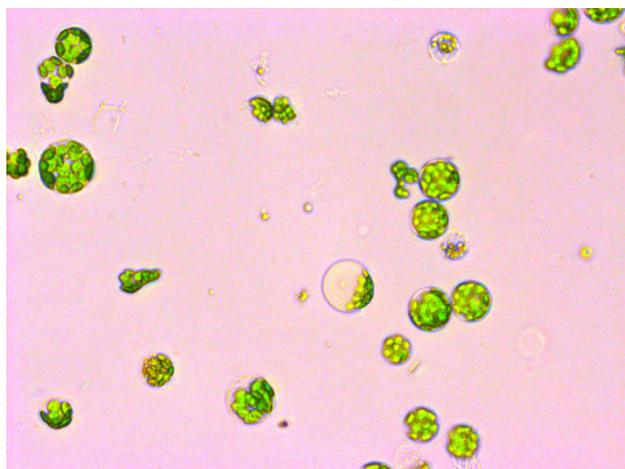


Opzione 1: rigenerazione da protoplasti senza inserimento di DNA esogeno

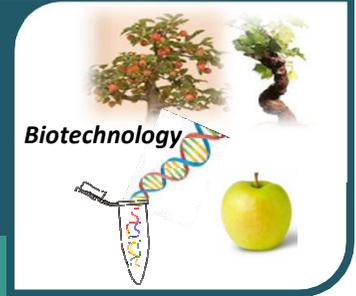
Center of Research & Innovation



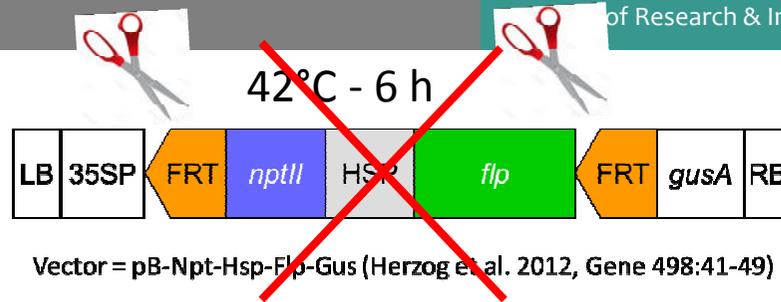
RNA guide + Cas9
endonuclease protein



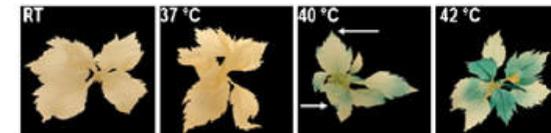
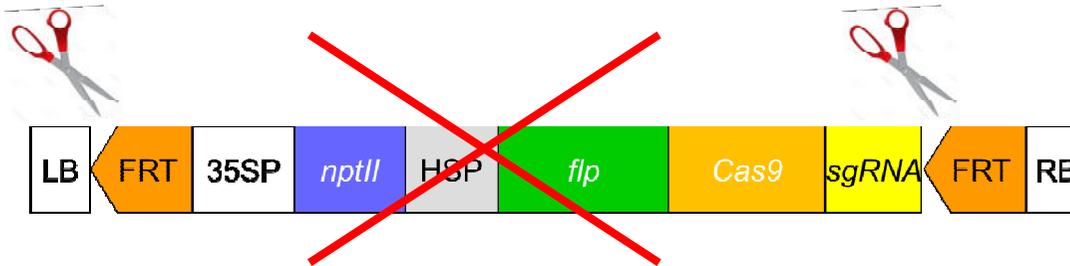
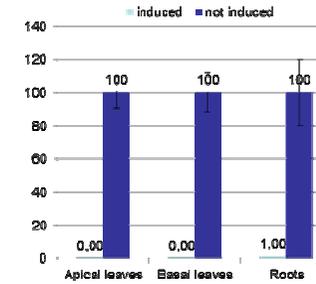
Opzione 2: eliminazione del DNA esogeno



of Research & Innovation

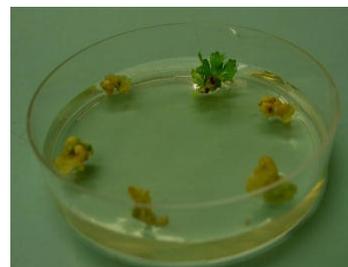


TOTAL REMOVAL OF *NPTII* FROM THE PLANT TISSUES ALSO IN THE PROPAGATED MATERIAL (Dalla Costa et al. 2016, PCTOC 124:471-481)



knock-out of pathogen susceptibility genes followed by CRISPR-Cas9 excision

Kanamycin selection





Perchè è necessario oggi un adeguamento della 18/2001

NON ricadono nella definizione vigente di OGM:

- Piante dove è stato eliminato il DNA transgenico (ma rimane solo il DNA cis-genico)
- Piante dove è stato eliminato il transgene CRISPR/Cas9 per realizzare il genome editing (ma resta il DNA editato) o è stato utilizzato in forma transiente
- Piante dove è stato eliminato il gene «early flowering» (senza che nessuna traccia di DNA transgenico sia identificabile perchè non c'è)
- Piante dove non è stato inserito alcun DNA esogeno ma si è editato il DNA già presente nel patrimonio genetico della pianta

Dal Corriere Imprese del 16/11/2015 in una intervista al Ministro Martina sulle nuove tecnologie (NBT) il Presidente della Coldiretti Emilia Romagna Mario Tonello dichiara: “La Coldiretti è sempre stata contro gli OGM come tecnologia ingegneristica che porta all’omologazione dei prodotti di qualità....
...Siamo favolrevoli allo sviluppo del Genome Editing e della cis-genesi che non hanno niente a che fare con l’ingegneria transgenica. È chiaro che anche per queste nuove tecnologie occorre un approccio di precauzione....”

The Swedesh Board of Agriculture the 17th of November 2015 dichiara quale primo organismo europeo:

“ CRISPR-Cas9 mutants **don’t fall under** the European GMO definition...”

Alla **Svezia** hanno dato seguito nel 2016 poi la **Germania**, **l’Olanda**, le **Fiandre**, la **Spagna**...



NATURE BIOTECHNOLOGY
VOLUME 34 NUMBER 6
JUNE 2016

BIOTECHNOLOGY

Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation

A fungus engineered using CRISPR-Cas9 can be cultivated and sold without oversight.

BY EMILY WALTZ

The US Department of Agriculture (USDA) will not regulate a mushroom that has been genetically modified with the gene-editing tool CRISPR-Cas9, the agency has confirmed. The long-awaited decision means that the mushroom can be cultivated and sold without passing through the agency's regulatory process — making it the first CRISPR-edited organism to receive green light from the US government.

"The research community will be happy with the news," says Cairns, a biologist at the Chinese Academy of Agricultural Sciences Institute of Genetics and Developmental Biology in Beijing, who led the team in developing the mushroom. "We're confident we'll see more CRISPR-edited crops coming outside of regulatory oversight."

Yinong Li, a plant pathologist at Pennsylvania State University (Penn State) in University Park, engineered the fungus — the common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) — to resist browning. The effect is achieved by targeting the family of genes that encodes polyphenol oxidase (PPO), an enzyme that causes browning. By deleting just a handful of genes, the fungus can be grown and sold without oversight.



The common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) has been modified to resist browning.

IN FOCUS NEWS

Primi champignons editati in commercio

Primo mais editato in commercio

CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation

In an effort to catch up with technology, the **White House** has ordered the USDA, the FDA and the EPA to update the system, known as the Coordinated Framework for the Regulation of Biotechnology (*Nat. Biotechnol.* **33**, 1221–1222, 2015).

The agencies enlisted help from a committee convened by the US National Academies of Sciences, Engineering and Medicine. The committee will attempt to predict “**the likely future products of biotech over the next 5–10 years**”