

CAFFÈ SCIENTIFICO

Palazzotto Biscari
Catania, 10 novembre 2023

IL DNA E LE BIOTECNOLOGIE VERDI

ALESSANDRA GENTILE

Uni
ct
Di3A

DIPARTIMENTO DI AGRICOLTURA, ALIMENTAZIONE E AMBIENTE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

«Agri cultura... est scientia quae sint in quoque agro serenda ac facienda quo terra maximos perpetuo reddat fructus»

Marco Terenzio Varrone (116 a.C.–27 a.C.)
nel *'De re rustica'*



«L'agricoltura è ... la scienza che insegna quali colture piantare in un tipo di terreno e quali operazioni condurre in modo che la terra dia le più elevate produzioni possibili in perpetuo»

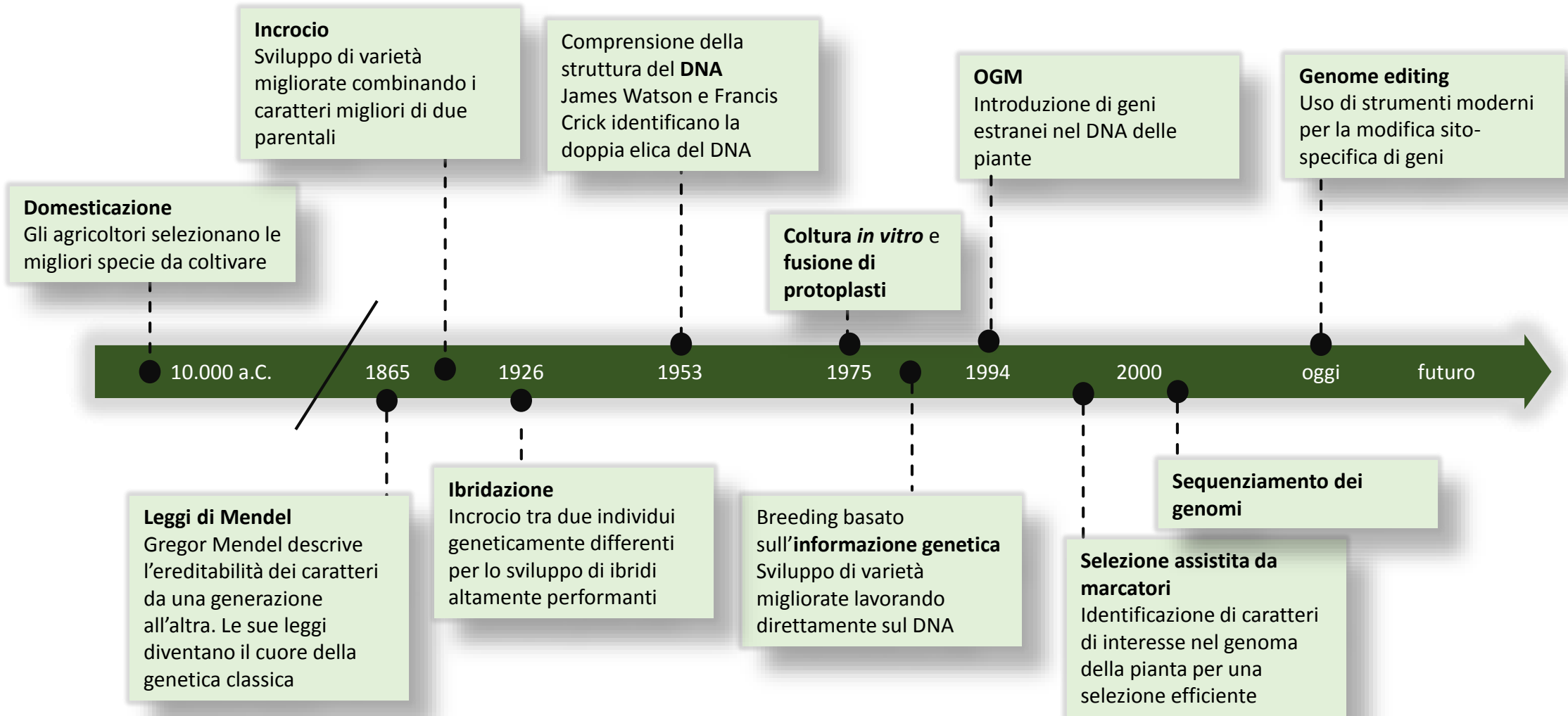
«Abbiamo anche vasti e diversi frutteti e orti....In esse praticiamo anche ogni genere di innesto e di inoculazione, tanto di alberi selvatici quanto di alberi da frutto, e questo dà molti risultati. E artificialmente facciamo in modo che, in questi stessi frutteti e orti, gli alberi e i fiori vengano prima o dopo rispetto alla loro stagione, e che crescano e diano frutto più speditamente di quanto non facciano secondo il loro processo naturale.

Artificialmente li rendiamo anche più grandi di quanto non siano in natura, e i loro frutti più grossi e più gustosi, e di sapore, di odore, di colore e di forma diversi dalla loro natura.... e parimente di produrre diverse piante nuove, differenti da quelle comuni, e di trasformare un albero o una pianta in un'altra»

Francesco Bacone (1561-1626) 'Nuova Atlantide'



La genetica, il miglioramento genetico e l'agricoltura



Gli obiettivi del miglioramento genetico

Rese e adattabilità
ambientale

- Consistente e costante
produttività

Qualità della produzione

- ~~Adattabilità~~ ~~ad~~ ~~condizioni~~ ~~di~~ ~~coltura~~ ~~diverse~~
- ~~Introduzione~~ ~~di~~ ~~resistenze~~

Aumento dei benefici agrari e ambientali

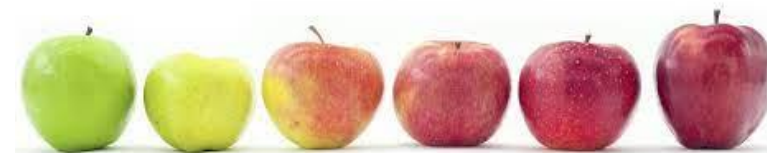
Diversificazione della
tipologia di prodotto

Aumento delle proprietà
salutistiche

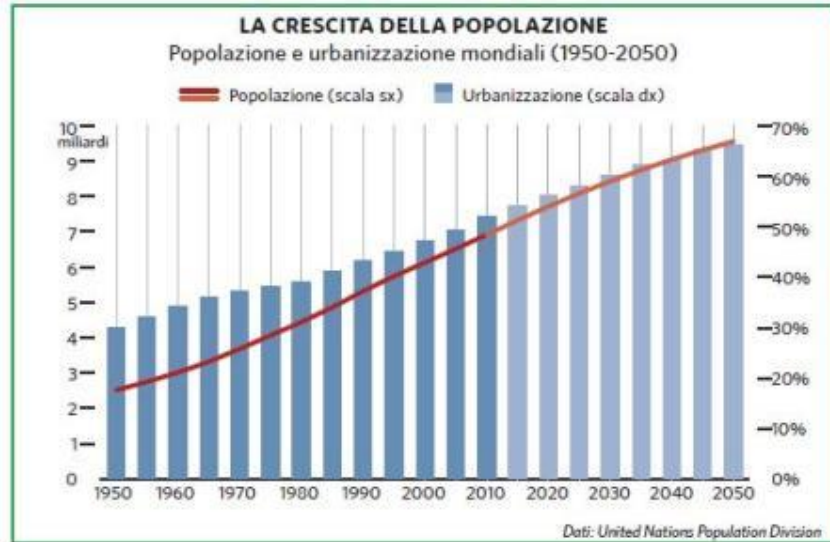
Introduzione di nuove
caratteristiche

caratteristiche

caratteristiche



Nuove sfide del miglioramento genetico



<https://www.preh1b.eu/>

Il clima sta cambiando.
L'alimentazione e l'agricoltura anche.

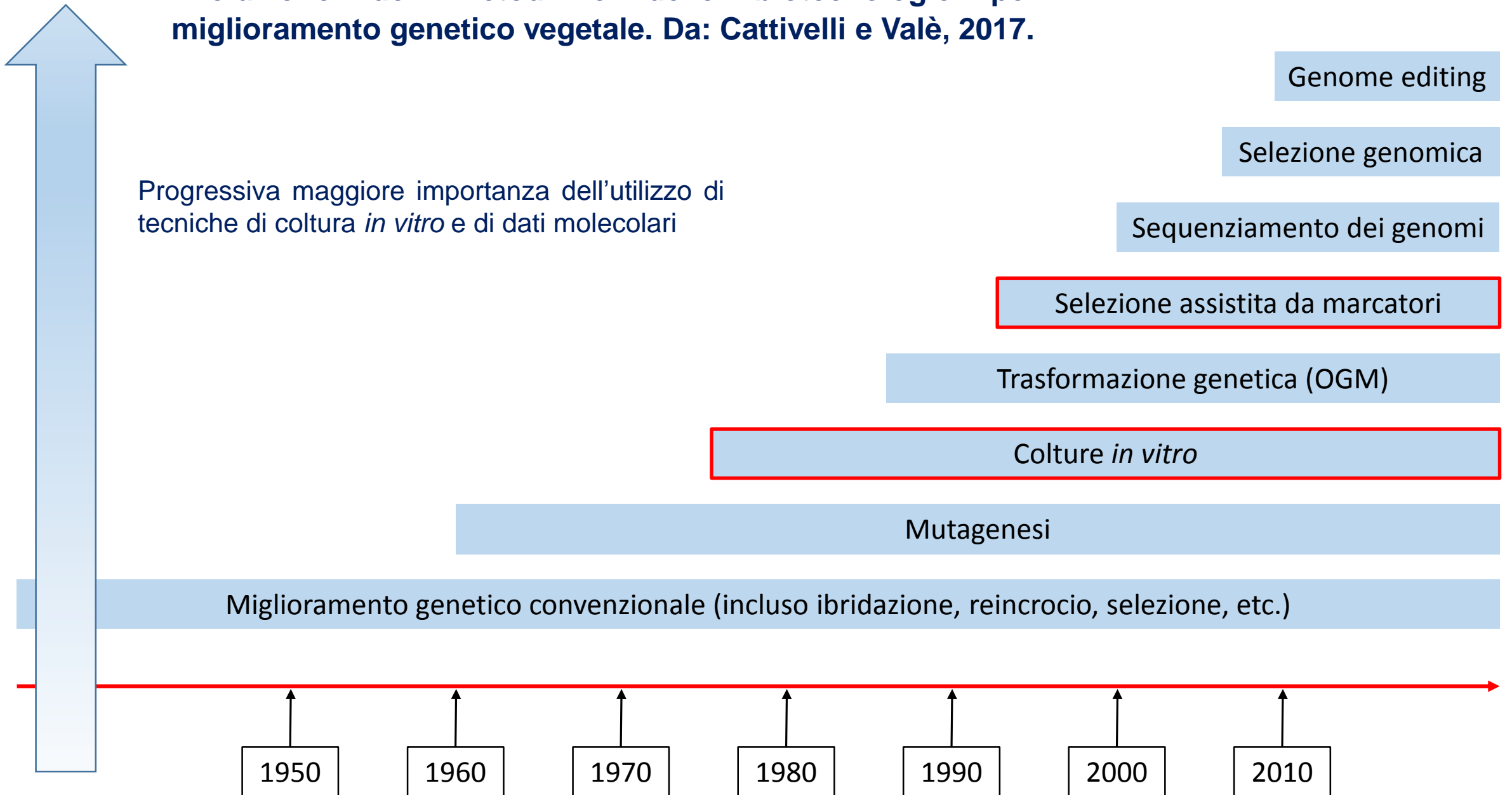


Ruolo dell'agricoltura per la sostenibilità



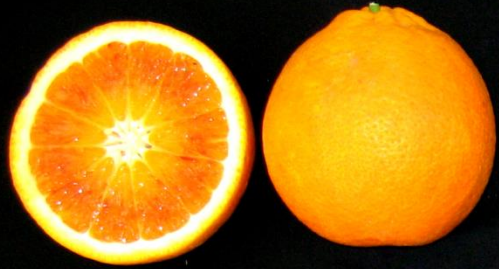
Evoluzione dei metodi e delle biotecnologie per il miglioramento genetico vegetale. Da: Cattivelli e Valè, 2017.

Progressiva maggiore importanza dell'utilizzo di tecniche di coltura *in vitro* e di dati molecolari



La (falsa e inutile) contrapposizione tra metodi tradizionali e innovativi

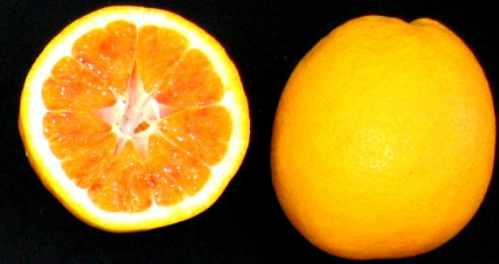
- Integrazione delle tecniche
- Esigenza di conoscenza delle informazioni sull'ereditarietà e non solo
- E' il momento di capitalizzare le informazioni che provengono dal sequenziamento dei genomi (e di investire per quelli che mancano)
- E' importante mantenere il patrimonio elitario di geni delle migliori varietà oggi coltivate



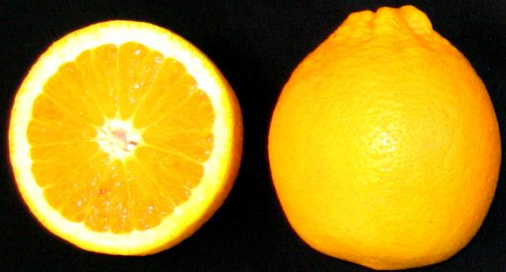
Gallo



57-1E-1



Meli



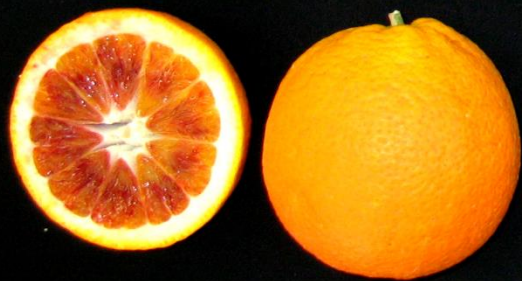
Sant' Alfio



Ippolito



Messina a f.r.



Rosso



Dal muso



Scirè

Miglioramento genetico inconsapevole

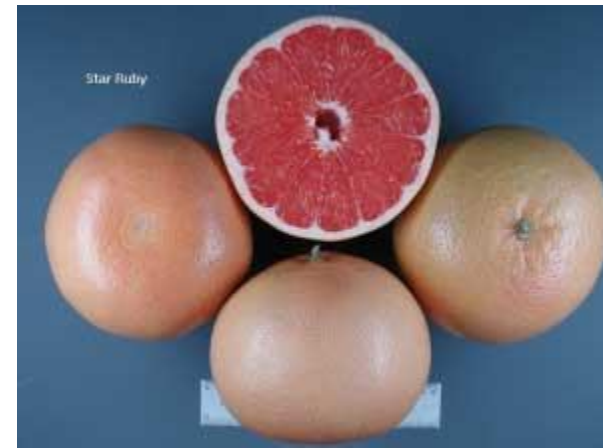
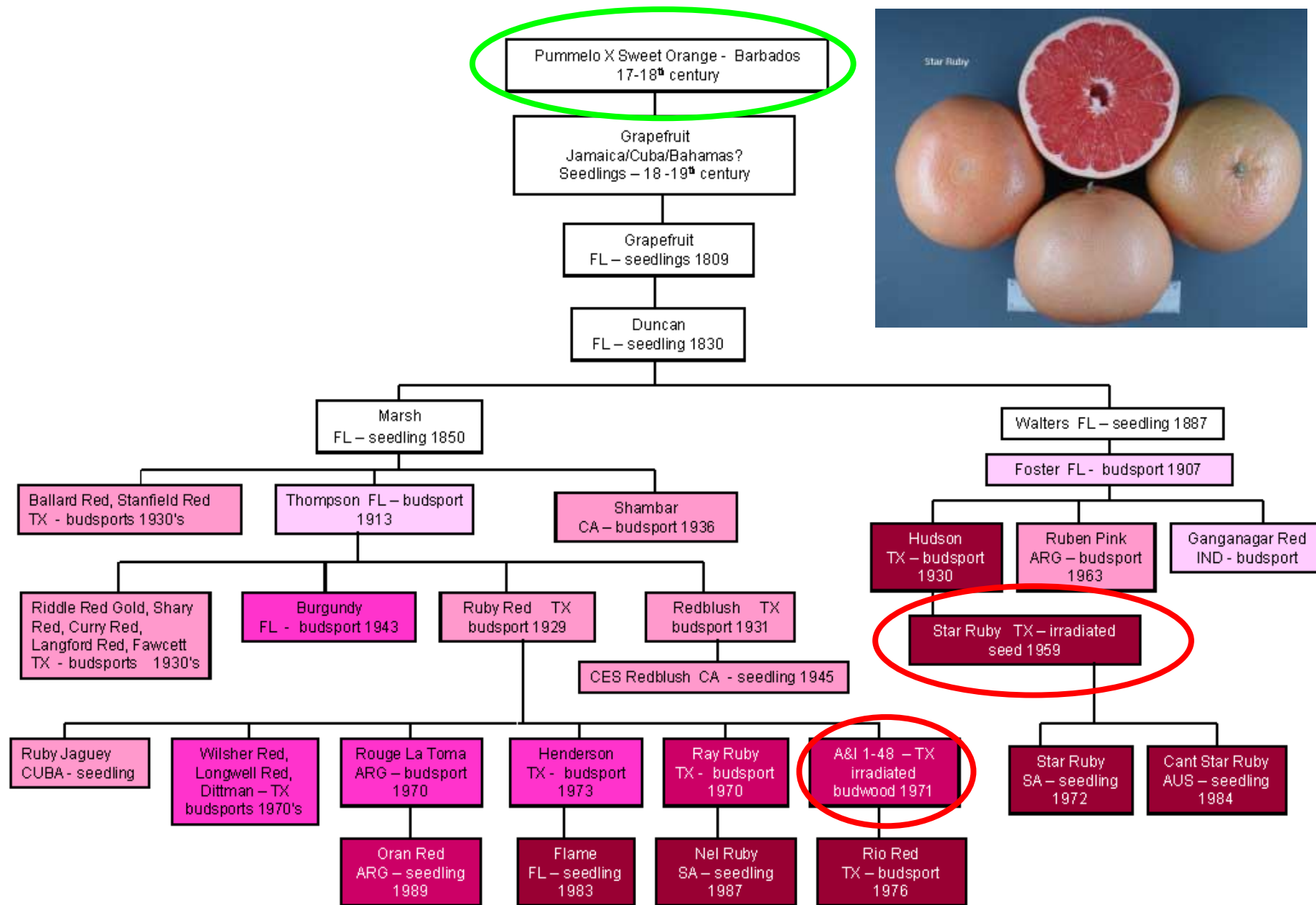
Il caso dei citrange

[*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]

- costituiti in Florida nel 1907 per trasmettere il carattere della resistenza al freddo dall'arancio trifoliato all'arancio dolce;
- sono divenuti importanti portinnesti degli agrumi diffusi in tutto il mondo per la loro tolleranza al virus della tristezza degli agrumi (CTV)



Fonte: citrusvariety.ucr.edu



Il caso del clementine...

Origine
ibrida



Selezione di
diverse mutazioni



Mutanti con
caratteri di
interesse

Uso dei mutanti per
studi relativi a
caratteri di interesse
agronomico



Limiti dei metodi convenzionali di miglioramento genetico

Lungo periodo giovanile nelle specie arboree

Alto livello di eterozigosi

Barriere riproduttive (sterilità maschile e/o femminile, auto- e/o inter-incompatibilità)

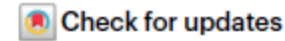
Grandi investimenti di tempo, spazio e denaro

Rendono il miglioramento genetico un processo lungo e difficoltoso!!!



Enhancing sustainable development through plant genetics

Pamela C. Ronald

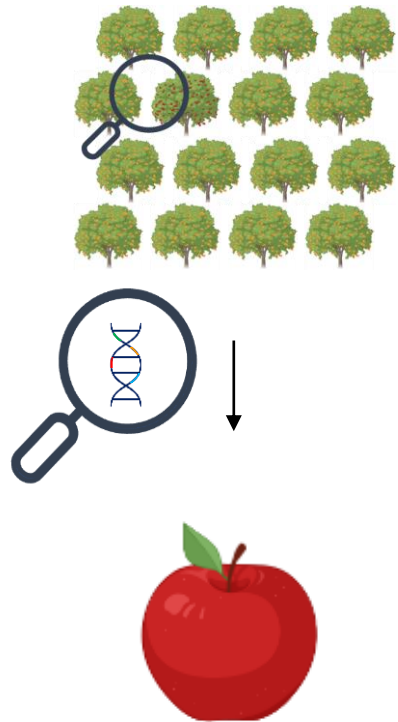


“Without changes to consumer behaviour or reductions in food waste, estimated food production will require an increase of 25–100% to meet food demands in the future”

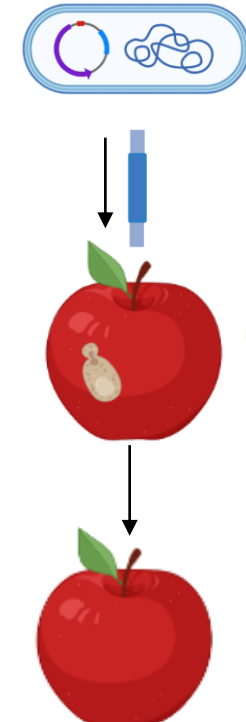
I metodi del miglioramento genetico

Metodi innovativi o biotecnologici

Selezione Assistita da
Marcatori



Transgenesi



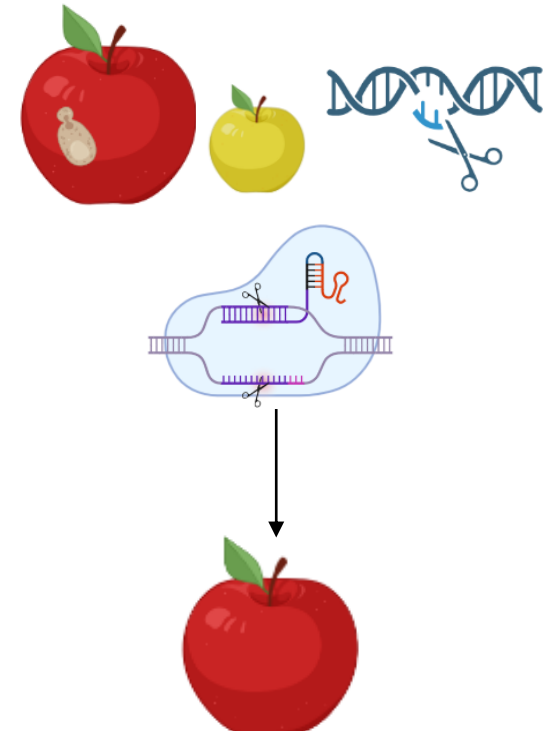
Trans-OGM

Cisgenesi
intragenesi



Cis-GMO

Genome editing



GEC



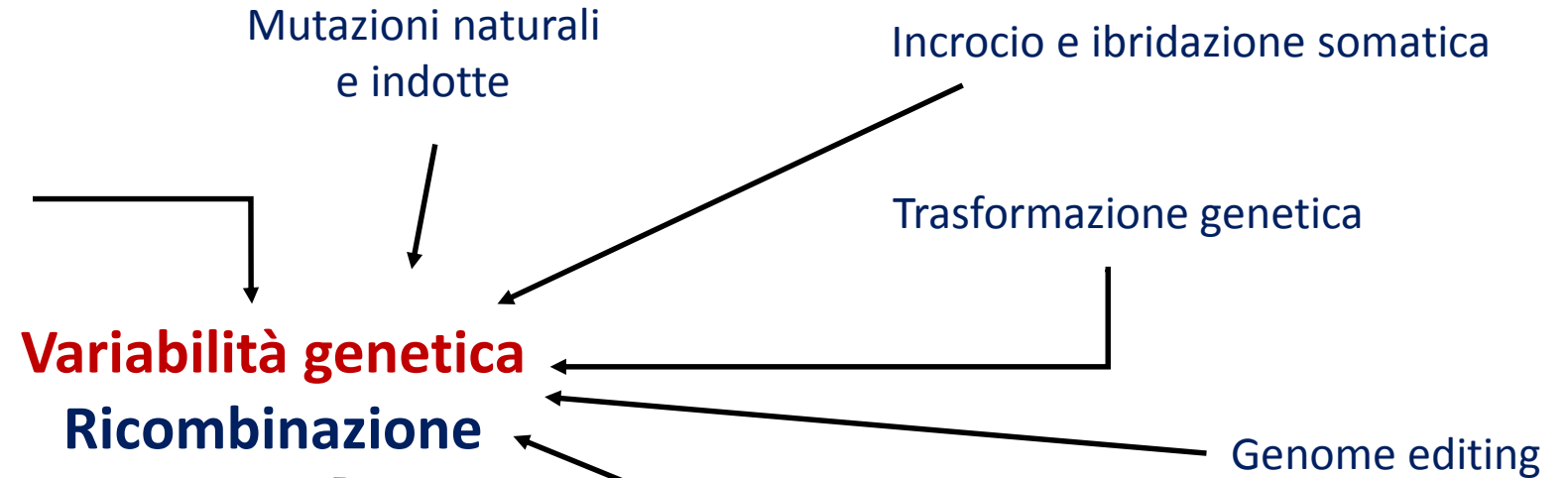
Agrobiodiversità



Nuove varietà

Risorse genetiche

Vecchie varietà, accessioni selvatiche, ecotipi (custodite in banche del germoplasma, campi collezione o di proprietà dei breeders)



Varietà migliorata

Registrazione

Moltiplicazione

Commercializzazione

Selezione

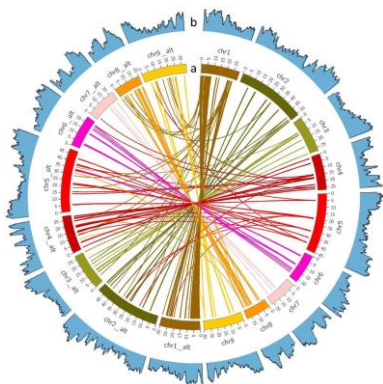
Prove di campo

Test di resistenza a stress

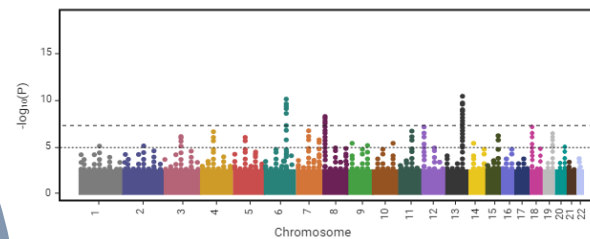
Marker assisted selection



Sequenziamento
dei genomi



Genetica
quantitativa



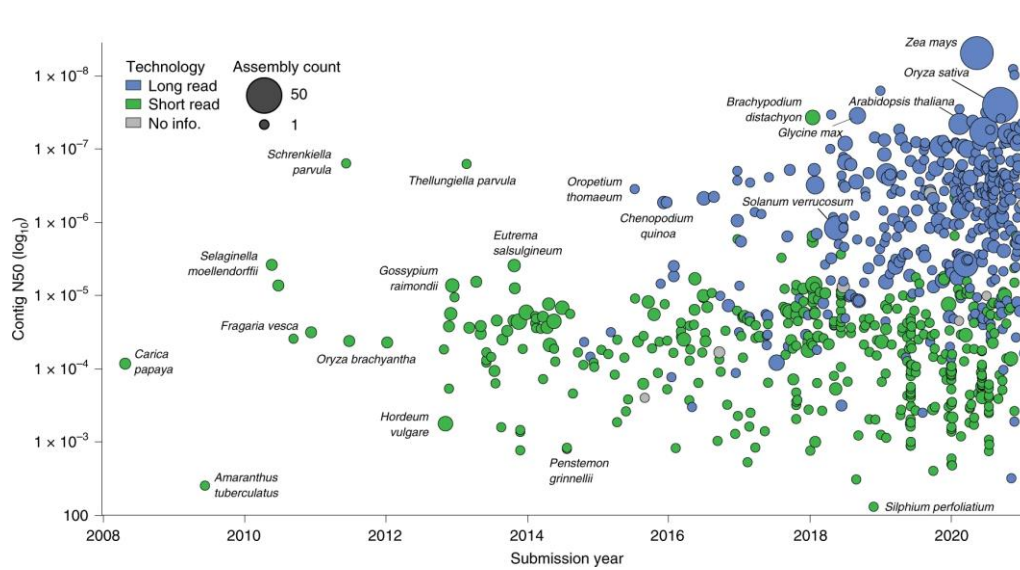
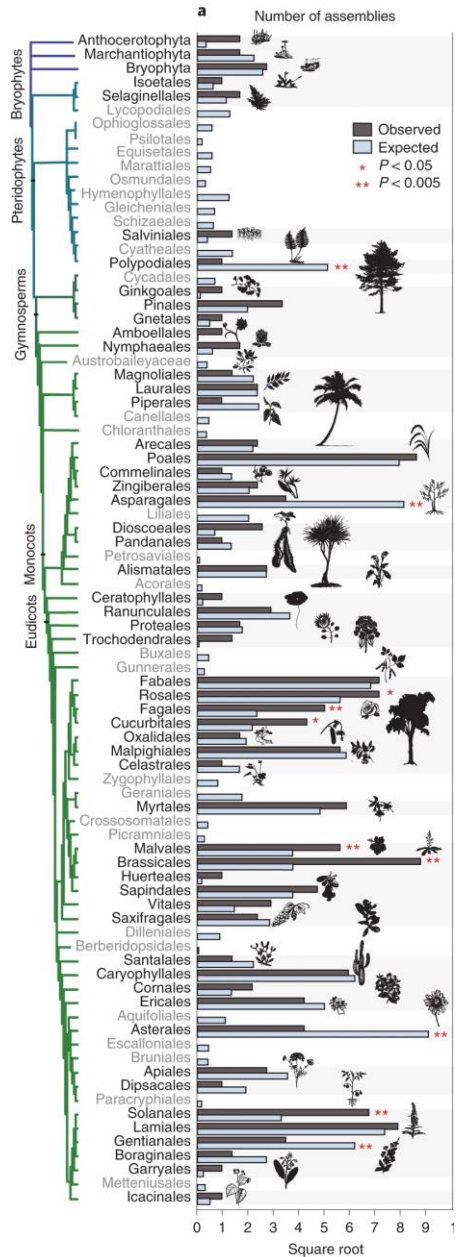
Fenotipizzazione
di precisione



Tecniche di selezione
assistita (TEA)



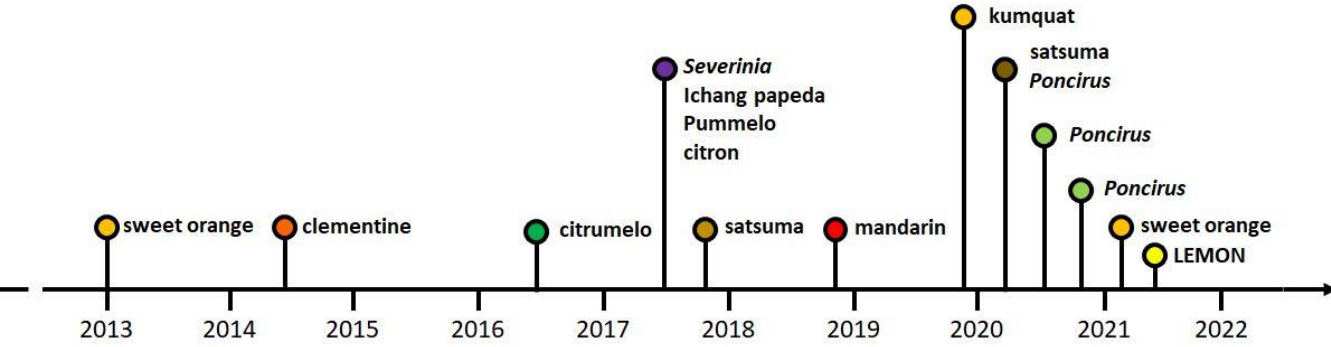
Genomi di riferimento sequenziati



Sono disponibili oggi 798 genomi di specie vegetali



Fonte: Marks, R.A. et al. 2021. Nature Plants



Tree Genetics & Genomes (2021) 17: 46
<https://doi.org/10.1007/s11295-021-01528-5>

ORIGINAL ARTICLE



The haplotype-resolved reference genome of lemon (*Citrus limon* L. Burm f.)

Mario Di Guardo¹ · Marco Moretto² · Mirko Moser² · Chiara Catalano¹ · Michela Troggio² · Ziniu Deng³ · Alessandro Cestaro² · Marco Caruso⁴ · Gaetano Distefano¹ · Stefano La Malfa¹ · Luca Bianco² · Alessandra Gentile^{1,3}

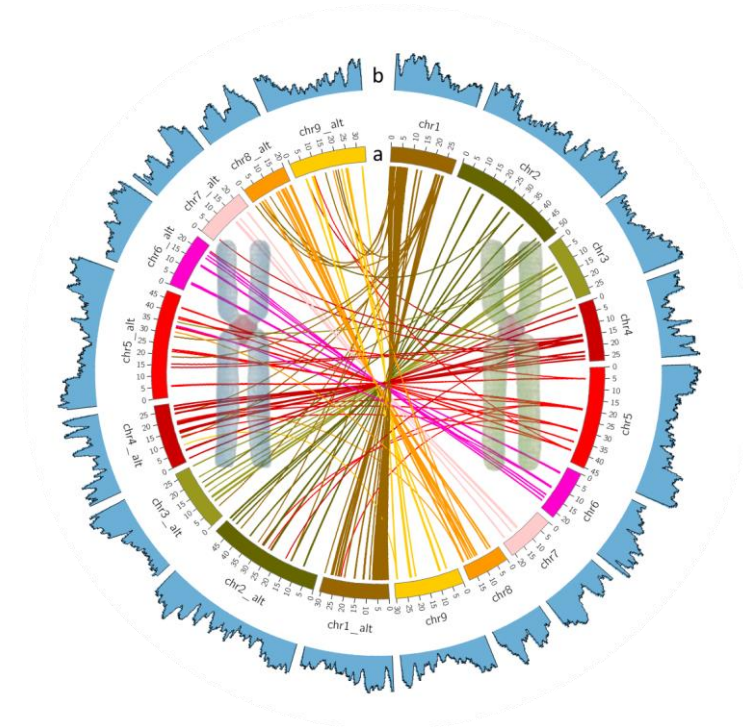


Primary

Genome Size: 312.8 Mb
 Scaffold: 811
 N50: 27.1 Mb
 Predicted transcripts: 38.205

Alternative

Genome Size: 324.74 Mb
 Scaffold: 799
 N50: 28.4 Mb
 Predicted transcripts: 37.753



Miglioramento genetico del limone per la resistenza al mal secco

- Ibridazione intra- e inter-specifica (Carrante e Bottari, 1951; Russo 1990)
- Selezione clonale (Damigella e Continella, 1970; Calabrese, 2001)
- Selezione nucellare (Perrotta e Tribulato, 2001)
- Introduzione di germoplasma straniero (vari autori)
- Variazione della ploidia (Geraci, 1986)
- Mutazioni indotte (Spina *et al.*, 1991)
- Selezione *in vitro* di callo e protoplasti (Gentile *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 1995)
- Ibridazione somatica (Tusa *et al.*, 1990; 1992; Deng *et al.*, 1995)
- C-ibridazione (Tusa *et al.*, 1999)
- Trasformazione genetica (Gentile *et al.*, 2007, Distefano *et al.*, 2008)



Resistenza dei frutti di limone transgenico a patogeni fungini

Lemon Fruits from Endochitinase Transgenic Plants Exhibit Resistance against Postharvest Fungal Pathogens

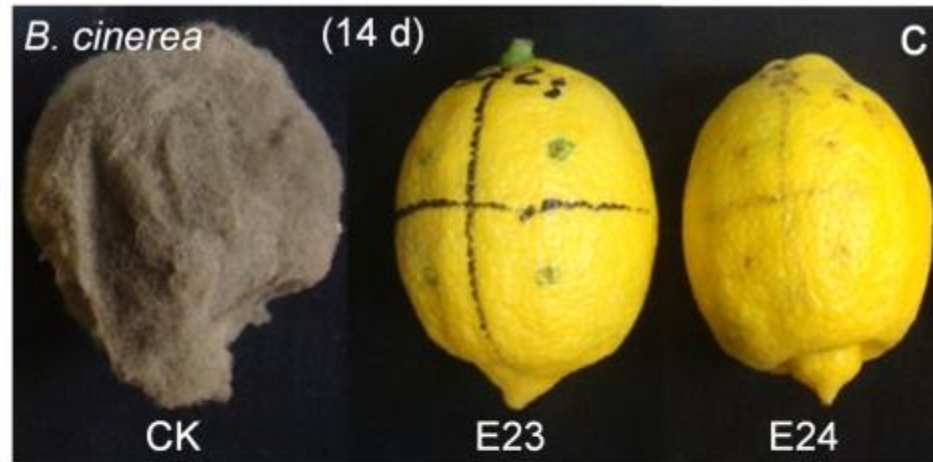
Cinzia Oliveri¹, Gaetano Distefano¹, Stefano La Malfa^{1,*}, Rosa La Rosa¹, Ziniu N. Deng² and Alessandra Gentile¹

¹Dipartimento di Scienze delle Produzioni Agrarie e Alimentari (DISPA), Catania, Italy

²Horticulture and Landscape College, Hunan Agricultural University, Hunan, China

*Corresponding author: slamalfa@unict.it

Proc. XIIth Intl. Citrus Congress
Eds.: B. Sabater-Muñoz et al.
Acta Hort. 1065, ISHS 2015



Substantial Equivalence of a Transgenic Lemon Fruit Showing Postharvest Fungal Pathogens Resistance

Vera Muccilli,^{||} Alessandro Vitale,^{||} Ling Sheng, Alessandra Gentile,* Nunzio Cardullo, Corrado Tringali, Cinzia Oliveri, Rosa La Rosa, Mario Di Guardo, Stefano La Malfa, Ziniu Deng, and Gaetano Distefano



Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2020, 68, 3806–3816

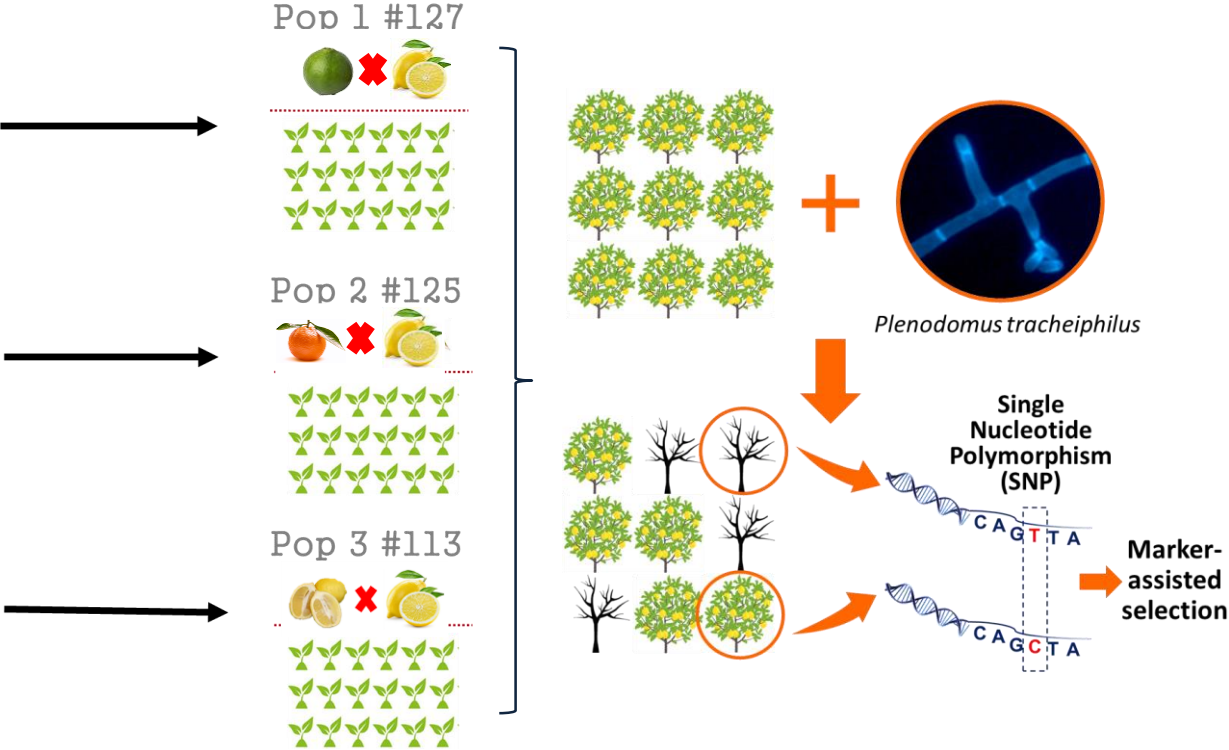
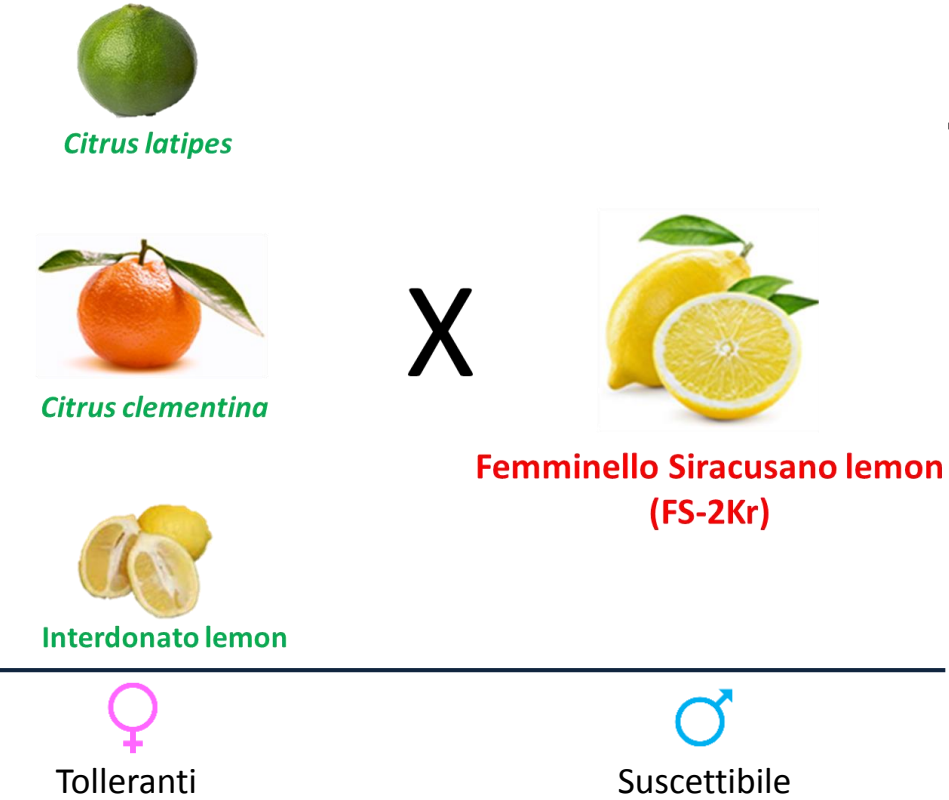


Read Online

Analisi con la risonanza magnetica nucleare (NMR) del metaboloma della buccia e della polpa dei frutti, dimostrano la **sostanziale equivalenza** dei profili del frutto del clone GM (resistente ai patogeni fungini) e di quello del clone originario

Miglioramento genetico del limone per la resistenza al mal secco

Identificazione di marcatori molecolari associati alla resistenza/tolleranza alla malattia

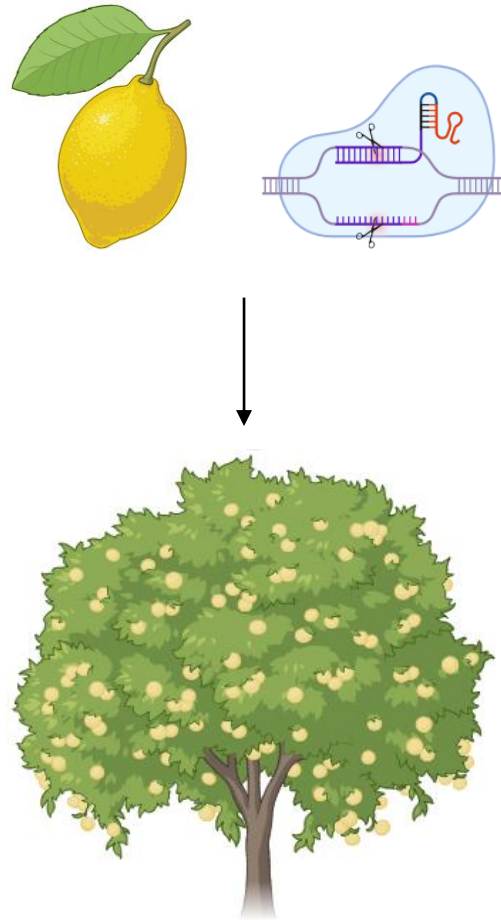


...oggi

Miglioramento genetico del limone per la resistenza al mal secco



Genome editing

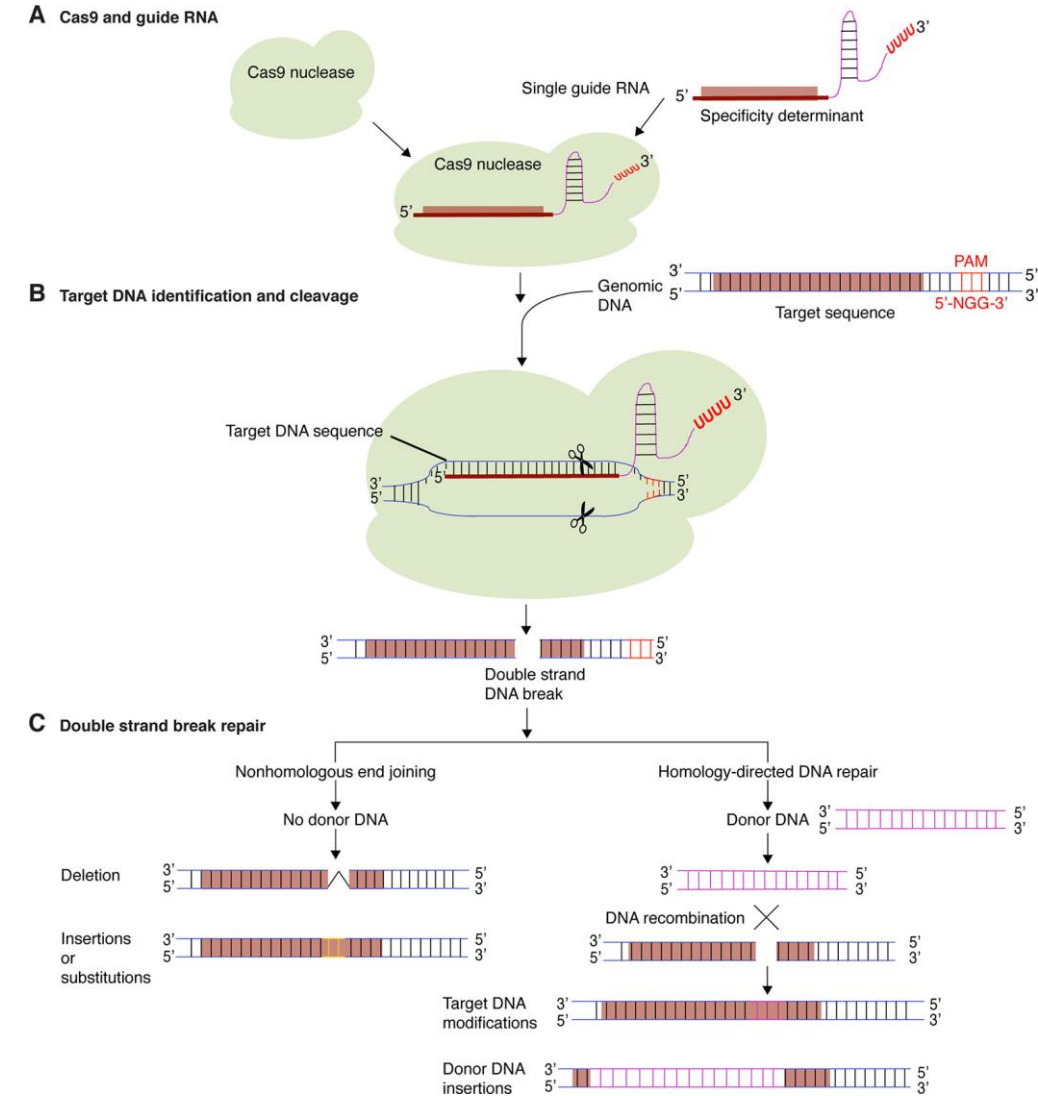


Introduzione dei geni di resistenza/tolleranza nelle varietà di interesse commerciale

...domani

Il genome editing: modifica del genoma

- ❖ Il CRISPR/Cas9 è un sistema evoluto da batteri per distruggere il DNA dei virus
- ❖ È un sistema per tagliare il DNA in un punto preciso del genoma
- ❖ Nelle versioni commerciali, il punto di taglio è predefinito dall'operatore (non è casuale)
- ❖ A seguito del taglio si attivano i naturali meccanismi di riparazione cellulare
- ❖ La riparazione può causare piccole mutazioni (equivalente alla mutagenesi chimica)
- ❖ Può essere usato per inserire un gene esogeno proveniente dalla stessa specie o specie sessualmente compatibili in un punto prefissato del genoma (transgenesi o cisgenesi)
- ❖ Funziona su tutti gli esseri viventi
- ❖ Richiede una buona conoscenza del genoma



El-Mounadi et al., 2020 Trends Plant Sci.

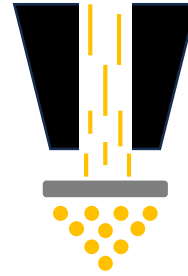
... è un OGM?

CRISPR/Cas: introduzione in pianta

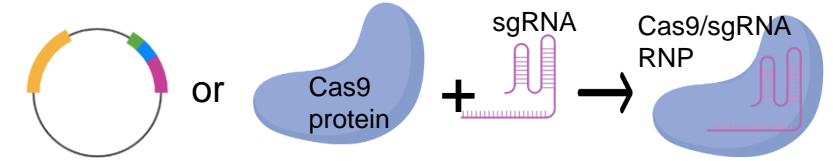
Trasformazione mediata da *Agrobacterium tumefaciens*: strategia del T-DNA



Bombardamento con particelle



Trasformazione di protoplasti mediata da PEG: strategia dei plasmidi o delle ribonucleoproteine (RNP)



Obiettivi

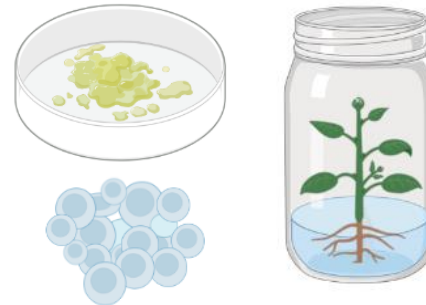
NESSUNA presenza di geni estranei

+

Disponibilità di efficienti protocolli di rigenerazione e trasformazione



Piante editate prive di transgeni

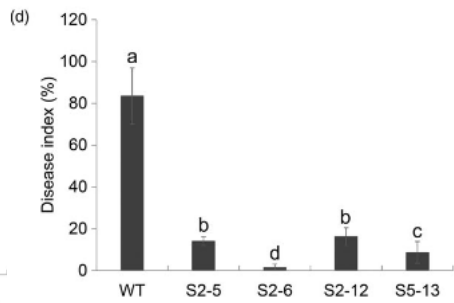
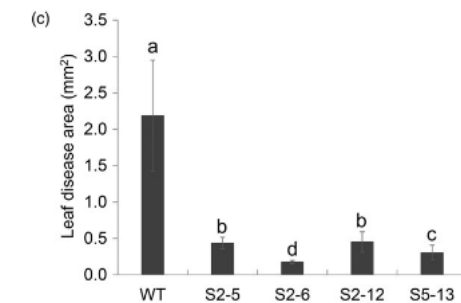
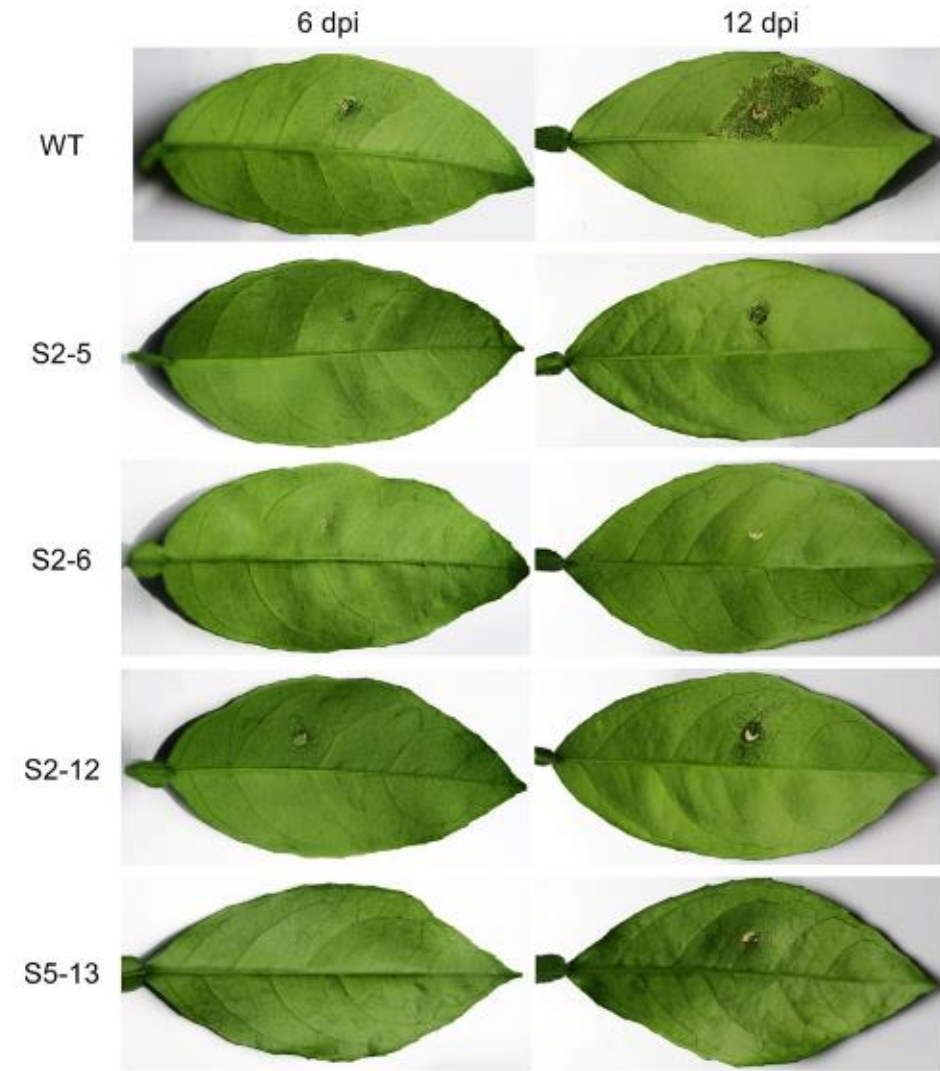
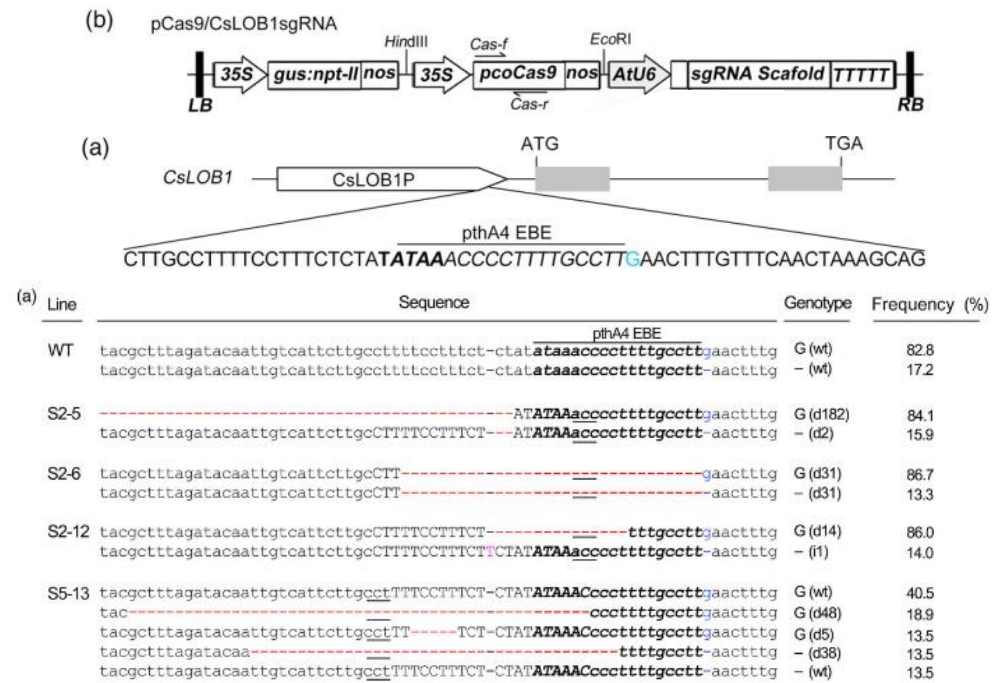


Engineering canker-resistant plants through CRISPR/Cas9-targeted editing of the susceptibility gene *CsLOB1* promoter in citrus

Aihong Peng^{1,2,†}, Shanchun Chen^{1,2,†}, Tiangang Lei^{1,2}, Lanzhen Xu^{1,2}, Yongrui He^{1,2}, Liu Wu², Lixiao Yao^{1,2} and Xiuping Zou^{1,2,*}

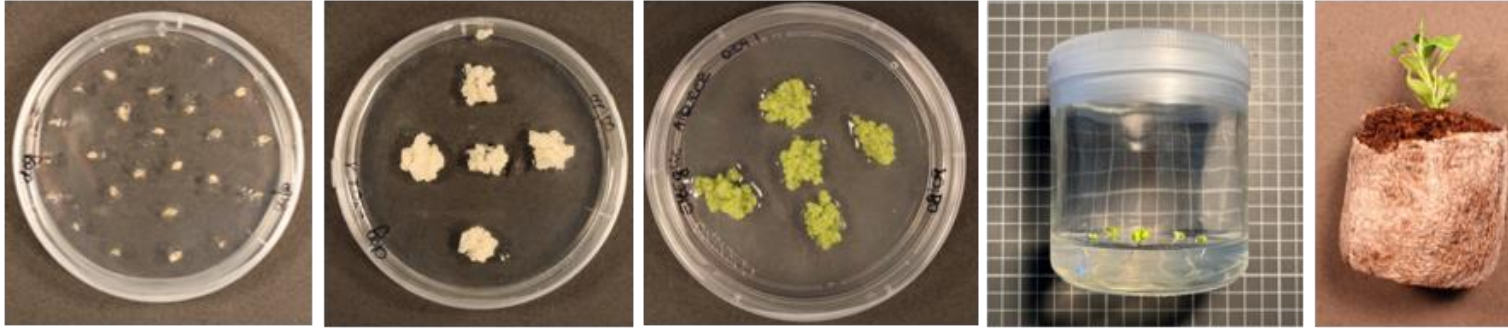
¹Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences and National Center for Citrus Variety Improvement, Chongqing, China

²Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing, China



L'edizione mediata da CRISPR/Cas9 del promotore del gene di suscettibilità *CsLOB1* è una strategia efficiente per la generazione di cultivar di agrumi resistenti al canker

Rigenerazione da calli embriogenici ottenuti da ovuli non fecondati



Orancio dolce:
'Tarocco Tapi'
'Tarocco Ippolito'



Mandarino:
'Afourer'
'Tardivo di Ciaculli'



Limone:
'Femminello'

Isolamento di protoplasti da calli embriogenici e rigenerazione



Esperimenti di genome editing in protoplasti sono in corso...

Parere dell'EFSA

L'EFSA ha dichiarato, in un parere richiesto dalla Commissione Europea, che cisgenesi e alcune modalità di *genome editing* **non sono assimilabili alle tecniche che generano gli OGM ma alle tecniche convenzionali**

(EFSA Journal 2012;**10**(2):2561; EFSA Journal 2012, **10**(10):2943)

ma...

Luglio 2018: Sentenza della Corte di giustizia europea che equipara le NBT (cisgenesi e genome editing) ai prodotti OGM in virtù del metodo utilizzato per il loro ottenimento

Parlamento Italiano

Il 30 maggio 2023, il Parlamento italiano ha approvato un emendamento al Decreto Legge Siccità che autorizza la sperimentazione in campo delle piante ottenute con i metodi TEA, le Tecnologie di Evoluzione Assistita prima consentita solo *in vitro* con una procedura semplificata

Si tratta della prima volta negli ultimi 20 anni che il Parlamento italiano si esprime a favore dell'innovazione genetica in agricoltura



CONCLUSIONI

- Il progresso dell'agricoltura è in larga parte sovrapponibile all'aumento delle conoscenze della genetica delle piante
- La biodiversità delle specie coltivate rappresenta un patrimonio fondamentale per soddisfare vecchi e nuovi bisogni dell'uomo (alimentari, energetici, ambientali)
- Le biotecnologie, nate con l'agricoltura, consentono il raggiungimento in tempi rapidi e con un minor livello di approssimazione di obiettivi importanti, tra i quali un ruolo di primo piano riveste la resistenza a stress biotici e abiotici
- La disponibilità dei genomi e la fenotipizzazione di precisione consentiranno, in combinazione con le TEA, di rispondere alle sfide attuali con nuove varietà, salvaguardando nel contempo il patrimonio genetico elitario di molte specie accumulatosi nel corso del tempo
- Verso una intensificazione sostenibile, il ruolo del miglioramento genetico (AISSA, 2019)



Grazie per la
cortese attenzione