



**TECNICHE
DI EVOLUZIONE ASSISTITA**

TEA

AgriScienza

INDICE

01	Tecnologie TEA per il futuro dell'agricoltura	1
02	CRISPR: le nuove frontiere dell'editing genomico	2
03	L'alimentazione del futuro	4
04	Editing genomico e sicurezza alimentare: viti resistenti	7
05	Editing genomico e sicurezza alimentare: banane resistenti	10
06	La genetica vegetale e la lotta alla siccità	13
07	Domesticazioni delle piante selvatiche nell'era genomica	16
08	L'editing genomico per combattere povertà e malnutrizione	18
09	Ultime frontiere della genomica in agricoltura: l'apomissia	20
10	L'editing vegetale per la ricattura dell'anidride carbonica	23
11	Frumento a basso contenuto di acrilammide grazie all'editing genomico	25
12	Editing genomico con grafting: è possibile avere piante editate interamente non-OGM?	27



01

Tecnologie TEA per il futuro dell'agricoltura

Le Tecniche di Evoluzione Assistita sono tecnologie di miglioramento genetico che permettono di ottenere in poco tempo piante capaci di resistere meglio alle malattie e agli stress ambientali sempre più frequenti a causa dei cambiamenti climatici.

di **Vittoria Brambilla**

Il punto non è come supereremo questa crisi alimentare ma come renderemo il nostro sistema produttivo resiliente alle sfide future. La guerra in Ucraina, il blocco degli export agroalimentari, il caldo e la siccità oggi mettono in crisi le coltivazioni in diverse zone del nostro paese, inclusa la Pianura Padana, dove la mancanza di piogge – senza precedenti negli ultimi 50 anni – sta spingendo gli agricoltori a seminare circa 3000 ettari in meno di riso quest'anno solo tra le risaie di Novara, Vercelli e Pavia (Ente Nazionale Risi).

Siamo all'alba di un secolo che, per ora, non accenna a molti cambiamenti rispetto al precedente in quanto a pandemie, guerre e carestie. Una delle poche cose a essere cambiate e che continua a cambiare è l'innovazione. Oggi, grazie a secoli di ricerca e progresso tecnologico, siamo in grado di tutelare la biodiversità delle specie, di rendere le coltivazio-

ni più salubri, più nutritive, con minor ricorso ai fitofarmaci e al contempo resilienti al cambiamento climatico attraverso quelle che nel mondo della scienza, e ormai non solo, sono conosciute come le TEA, Tecnologie di Evoluzione Assistita.

Inaugurate nel decennio scorso, le nuove tecniche genomiche TEA permettono di apportare delle micro-modifiche all'interno dell'informazione genetica delle piante (DNA), riproducendo gli effetti dell'evoluzione biologica naturale, senza quindi la necessità di introdurre nuovo materiale genetico, come avviene nel caso degli Organismi Geneticamente Modificati (OGM). Con le TEA si possono produrre, ad esempio, nuove tipologie di riso che necessitano di un minor apporto di acqua, ma anche di fertilizzanti e agrofarmaci perché ad esempio resistenti a malattie quali il "brusone".

Piante migliorate tramite le TEA all'estero hanno già raggiunto il mercato: un esempio sono i pomodori ad alto contenuto di GABA che ha effetti positivi sul cuore, molto apprezzati dai consumatori in Giappone, mentre il percorso di riconoscimento legislativo europeo è ancora in corso. Qui la Commissione, su sollecitazione del Consiglio UE, ha pubblicato nell'aprile 2021 un accurato studio da cui si conclude che le TEA servono all'agricoltura europea ed è necessaria una revisione della normativa sul loro utilizzo.

Nel frattempo, in Italia, le associazioni di categoria Coldiretti, Confagricoltura e CIA si sono espresse a favore dell'utilizzo delle TEA, coerentemente anche con gli obiettivi di preservazione della ricchezza biologica delle varietà tipiche italiane, oggi più che mai minacciate dai cambiamenti di resa dei suoli e dagli effetti del cambiamento climatico.

02

CRISPR: le nuove frontiere dell'editing genomico

Dalla medicina alla genetica, dall'agricoltura alla microbiologia: le applicazioni di Crispr, la tecnica taglia-incolla del Dna, sono possibili in tantissimi campi. Questa innovativa tecnologia è di grande interesse per il settore agroalimentare e potrebbe rappresentare una vera rivoluzione.

di **Anna Meldolesi**

La tecnica CRISPR compie dieci anni quest'estate: tra la fine di giugno e l'agosto del 2012, infatti, la rivista *Science* pubblicava – prima online e poi su carta – l'articolo scientifico che avrebbe regalato il premio Nobel per la chimica 2020 alle due scienziate Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier. Più o meno nello stesso periodo, il 20 luglio di quest'anno, la comunità scientifica festeggerà il duecentesimo compleanno di Gregor Mendel, i cui esperimenti con i piselli hanno gettato le basi della genetica. Il momento è perfetto, dunque, per interrogarsi sul potenziale dell'innovazione genetica in agricoltura. A che punto siamo e cosa possiamo aspettarci, in particolare, dall'*editing* genomico in campo agroalimentare?

Editare un genoma è un'operazione simile alla correzione dei refusi in un file di Word. Bisogna avere

sotto gli occhi il testo, ovvero bisogna conoscere la successione delle lettere del DNA nella specie di interesse. E occorre disporre di uno strumento programmabile, in grado di scovare gli errori e correggerli, come la funzione trova-e-sostituisci di Word. CRISPR serve proprio a questo: il suo elemento chiave (la proteina Cas) è un enzima che può essere facilmente programmato per identificare una sequenza bersaglio e modificarla. Il tipo di modifica dipenderà da quale modello di CRISPR viene usato e da come è stato accessorizzato. CRISPR si posiziona sulla sequenza come il cursore in un testo di Word. Se c'è un gene dannoso può silenziarlo, come se cancellasse una parola di troppo. Se c'è un refuso da sistemare, per far funzionare meglio un gene, può modificare la sequenza usando uno stampo o, nei modelli più avanzati, può sovrascrivere singole lettere del DNA. Se quello che si desidera è mantenere un gene così com'è, variando soltanto l'enfasi con cui viene letto, allora si può effettuare il cosiddetto *editing* "epigenetico" che assomiglia a una rifinitura editoriale con sottolineature, corsivi e grassetti.

Una finezza di intervento simile era inimmaginabile prima dell'invenzione di CRISPR. Per millenni i nostri antenati e le nostre antenate hanno modificato lentamente, ma inesorabilmente, le piante di interesse alimentare attraverso incrocio e selezione. Poi sono arrivate la mutagenesi indotta (potente ma imprecisa), l'ingegneria genetica (efficace ma controversa), la selezione assistita da marcatori (utile ma laboriosa). Finché CRISPR e le sue varianti (*base editing*, *prime editing*, CRISPRon/off e altre ancora) hanno aperto una nuova stagione.

Il risultato del nuovo mix di versatilità e precisione è che non dobbiamo più aspettare che una mutazione fortunata si verifichi in modo causale. E non dobbiamo più limitarci a sperare di trovarla in natura come se fosse il proverbiale ago nel pagliaio. Possiamo acquistare il biglietto vincente alla lotteria dell'evoluzione naturale, inducendo un singolo cambiamento mirato del tutto simile a una mutazione spontanea. E possiamo operare correzioni più o meno estese senza che i prodotti finali contengano DNA estraneo.

Quante nuove possibilità si aprono? Tante e su Agri-Scienza racconteremo i filoni più interessanti, dalla qualità nutrizionale alla sicurezza alimentare, dalla sostenibilità ambientale all'adattamento ai cambiamenti climatici, fino al recupero della biodiversità perduta.

03

L'alimentazione del futuro

I pomodori arricchiti di provitamina D3, sviluppati grazie alla collaborazione tra il CNR e il *John Innes Center* di Norwich, rappresentano una delle prime e promettenti applicazioni nel campo del miglioramento nutrizionale delle piante grazie all'editing genomico.

di *Anna Meldolesi*

Il miglioramento nutrizionale delle piante è uno dei filoni di ricerca che stanno ricevendo nuovo impulso grazie all'editing genomico. Prendiamo la vitamina D₃. Le persone che soffrono della sua carenza nel mondo sono circa un miliardo. Le piante non la contengono naturalmente, ma alcune di esse (solanaceae) sono in grado produrre il suo precursore (colesterolo) all'interno di una via biosintetica che porta alla sintesi di alcuni metaboliti secondari (glicocaloidi). Fortuna vuole che possano essere indotte ad accumulare la provitamina D3 spegnendo il gene responsabile di questa reazione. Per ottenere questo risultato è sufficiente un intervento genetico puntiforme, del tutto simile a una mutazione spontanea. Lo ha dimostrato un lavoro pubblicato nel 2022 su *Nature Plants*¹ da ricercatori dell'Istituto di Scienze delle produzioni alimentari del CNR di Lecce e del *John Innes Center* di Norwich.

Lo studio ha attirato l'attenzione dei media internazionali perché i pomodori arricchiti di provitamina D₃ sviluppati dalla collaborazione italo-inglese rappresentano l'avanguardia di una promettente tipologia di prodotti. Alimenti modificati per rispondere a esigenze di salute reali, nell'ottica di un'alimentazione che in futuro tenderà a essere sempre più personalizzata.

“Il risultato dell'editing e dei successivi incroci è che il pomodoro biofortificato ha poche basi di differenza rispetto alle piante madri e non contiene DNA estraneo” - ci dice Angelo Santino.

“Secondo i primi calcoli un paio di pomodori al giorno dovrebbero essere sufficienti a soddisfare il fabbisogno di una persona” - aggiunge il ricercatore del CNR. Insomma, questi pomodori hanno buone speranze di non essere penalizzati dal punto di vista regolatorio in un numero crescente di paesi e di incontrare il favore dei consumatori, aggiunge il ricercatore del CNR. Insomma, questi pomodori hanno buone speranze di non essere penalizzati dal punto di vista regolatorio in un numero crescente di paesi e di incontrare il favore dei consumatori.

L'organismo umano non può fare a meno di questa vitamina importante per la regolazione del calcio, e dunque per la crescita e la salute delle ossa. Rachitismo e osteoporosi, oltretutto, non solo l'unico rischio da considerare² : anche cancro, Parkinson, demenza e altre malattie possono essere associati

alla deficienza di vitamina D₃. Per procurarsela, visto che i vegetali ne sono privi, è necessario consumare alimenti di origine animale – come pesce, uova e fegato – e poi fare affidamento sull'aiuto del sole per convertire il precursore nella forma attiva. Alcuni funghi sono in grado di produrre provitamina D₂, che però è meno stabile ed efficace. In definitiva, ad avere bisogno di integratori mirati sarebbero in tanti: i vegani, chi vive a latitudini poco soleggiate, chi ha una pelle abbastanza scura da schermare i raggi UV, gli anziani. Nel nostro continente però siamo in pochi a preoccuparcene, infatti si stima che ben il 40% degli europei sia carente (negli USA la percentuale si dimezza).

Lo stratagemma usato dai ricercatori è stato inattivare con un semplice taglio mirato (knock-out) il gene che codifica per l'enzima bersaglio (Sl7-DR2). Poiché la via metabolica per la sintesi dei glicocalcoidi non è indispensabile per la crescita del pomodoro, le linee mutanti hanno mostrato una riduzione di questi metaboliti secondari e non hanno risentito della modifica, secondo i primi risultati della prima prova in campo che si è svolta in Gran Bretagna. In compenso la provitamina D₃ si è accumulata nei frutti e ancor più nelle foglie, e i test di laboratorio hanno dimostrato che una percentuale importante (circa il 30%) viene convertita dalla luce ultravioletta nella forma attiva.

“Coltivando queste piante nel sud Italia, dove l'irraggiamento è molto più forte che in Gran Bretagna, e magari seccando i frutti al sole, il livello potrebbe aumentare ancora” sostiene Santino. Le foglie, inoltre, potrebbero essere usate per produrre integratori, che oggi si basano su una sostanza escretata dalle pecore e purificata dalla lana (lanolina).

Per dimostrare gli effetti salutistici degli alimenti fortificati servono studi mirati a partire da quelli condotti su modelli animali. Ma CNR e John Innes Center hanno maturato esperienza anche in questo campo, collaborando alla produzione di linee di pomodoro arricchite in polifenoli utilizzando un approccio di ingegneria genetica classica (trangenesi) nella speranza di prevenire le patologie infiammatorie dell'intestino³. Il miglioramento nutrizionale, in questi casi, ha riguardato diverse classi di polifenoli e ha richiesto l'inserimento di geni esogeni (sia regolatori che strutturali) originari di altre piante.

“Normalmente il pomodoro produce pochi flavonoli e soltanto nella buccia, mentre non accumula né antociani né stilbeni” - spiega Santino.

Dagli esperimenti con i topi, alimentati con pomodori identici in tutto tranne che per i biocomposti desiderati, è emerso che, utilizzando nella dieta una linea arricchita con diverse classi di polifenoli (flavonoli, stilbeni, antociani) è stato possibile ridurre lo sviluppo dell'infiammazione intestinale ed avere risultati positivi sul microbiota intestinale⁴.

Perché sono stati scelti proprio i pomodori?

“Questa pianta offre molti vantaggi: è una delle più coltivate al mondo, cresce bene in serra e i suoi frutti possono essere consumati crudi, senza danneggiare i biocomposti termolabili”

risponde il ricercatore del CNR. In genere si usa una cultivar chiamata *moneymaker*, ma gli stessi approcci possono essere applicati a varietà locali e anche ad altre specie come il peperone, a patto di mettere a punto protocolli efficienti di trasformazione e rigenerazione.

Allargando lo sguardo alla sicurezza nutrizionale nel suo complesso, occorre tenere conto che i consumatori presentano carenze alimentari diverse, in termini di vitamine, metaboliti secondari e altri micronutrienti, che variano a seconda di età, genere, patologie, stili di vita.

In un futuro che non è ancora a portata di mano, la speranza è di poter indicare a ciascuno gli alimenti più adatti. Ad esempio, a chi soffre del morbo di Crohn o di colite ulcerosa, ma anche di patologie cardiovascolari oppure neurovegetative.

Per avvicinarci a questo traguardo, probabilmente, serviranno diversi approcci di ingegneria metabolica, e anche lo sviluppo di screening rapidi, in grado di verificare prodotto per prodotto le reali potenzialità per la prevenzione delle malattie umane.

¹ <https://www.nature.com/articles/s41477-022-01154-6>

² <https://www.nature.com/articles/s41477-022-01158-2>

³ <https://www.nature.com/articles/ncomms9635>

⁴ <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2017.00075/full>

04

Editing genomico e sicurezza alimentare: viti resistenti

I genetisti italiani sono tra i più impegnati a studiare il potenziale delle biotecnologie di precisione per una viticoltura sostenibile e di qualità. L'obiettivo è difendere i vitigni dai nemici biologici e dagli stress climatici senza danneggiarne l'identità genetica

di **Anna Meldolesi**

“C'è più spirito in queste bottiglie che in tutti i libri di filosofia del mondo”

scriveva nel 1843 Louis Pasteur pregustando il piacere di brindare con un amico (Charles Chappuis). Il microbiologo francese, di cui si è celebrato da poco il bicentenario della nascita, è stato uno dei padri della scienza del vino, oltre che della teoria dei germi. Chissà cosa scriverebbe oggi, sapendo quanto lavoro stanno facendo i genetisti per preservare lo spirito degli antichi vitigni e proteggerli al tempo stesso dalle insidie degli agenti patogeni.

A dispetto di quanto si legge nel dizionario dei sinonimi e dei contrari, conservazione e innovazione sono destinate ad andare a braccetto nell'agricoltura di qualità, e dunque anche in viti-

coltura.

L'editing potrebbe essere d'aiuto perché consente interventi genetici leggeri e mirati, utili a mantenere intatta l'identità genetica delle varietà e le rispettive caratteristiche organolettiche, mentre se ne potenzia la resistenza alle malattie.

L'Italia è il paese più impegnato nell'editing della vite, con almeno quattro gruppi attivi tra la Fondazione Edmund Mach in Trentino Alto Adige, l'Università di Verona che ha lanciato anche uno spin-off dedicato (EdiVite), il Centro di Ricerca in Viticoltura ed Enologia del Crea che fa capo al Ministero dell'agricoltura, il CNR con l'Istituto per la Protezione Sostenibile delle Piante di Torino. Si lavora per mettere le viti in condizioni di tollerare gli stress climatici, ma soprattutto per proteggerle dai nemici biologici. Gli agenti patogeni vegetali proprio come quelli umani, evolvono e viaggiano. Per applicare meno pesticidi, nell'ottica della sostenibilità ambientale, dovremo fare affidamento sulle contromisure genetiche. I bersagli su cui agire si possono dividere in due grandi categorie: geni della suscettibilità e geni della resistenza.

I primi sono i geni della pianta che il patogeno usa per poterla infettare. Si tratta di target adatti per la tecnica CRISPR, perché possono essere silenziati facilmente con un knock-out. Basta eseguire un taglio mirato con le forbici di CRISPR e il gene è disattivato ci dice Michele Morgante. Il genetista dell'Università di Udine ha un'esperienza più che ventennale nello

sviluppo di viti resistenti grazie agli incroci guidati da marcatori ma intende riprendere a lavorare anche con l'editing.

L'alternativa è inserire geni che conferiscano resistenza, prendendoli in prestito da altre piante, in questo caso dalle viti selvatiche.

“Se invece di fare un semplice taglio si usa l'editing per inserire un segmento di DNA si potrebbe ricadere nella categoria della cisgenesi, e questo può rappresentare un ostacolo in più sul piano regolatorio” aggiunge il genetista. Dal punto di vista scientifico i pro e i contro delle due strategie vanno valutati caso per caso.

Il gene della pianta che viene spento per ridurre la suscettibilità aveva certamente altre funzioni, perché non può essersi evoluto per favorire un patogeno. Dunque, inattivandolo potrebbe verificarsi qualche contraccolpo, ad esempio si potrebbe aprire la strada ad altre malattie.

“Per una pianta annuale non è un grosso problema. Ma la vite vive decenni, perciò prima di procedere a piantare una varietà con geni della suscettibilità editati bisognerebbe fare una sperimentazione di lungo periodo” - ragiona Morgante. Agire sulla suscettibilità, comunque, comporta anche un grosso vantaggio: Si conferisce una protezione durevole, perché non si innesca la rincorsa tra ospite e patogeno a chi muta più velocemente.

Le malattie su cui finora si sono concentrati gli sforzi dei genetisti sono oidio e peronospora, due funghi che sono arrivati in Europa nel XIX secolo approfittando della vulnerabilità dei nostri vitigni. Il gene della suscettibilità all'oidio è noto da tempo, sin dai pionieristici studi di Francesco Salamini sull'orzo.

Più recentemente, lavorando sulla pianta modello *Arabidopsis*, un gruppo dell'Università di Utrecht ha individuato il gene di suscettibilità alla peronospora e ben presto lo stesso gene è stato riconosciuto in altre specie, dal pomodoro alla vite.

Per quanto riguarda l'altro approccio, quello dei geni di resistenza, la protezione conferita dura fin tanto che i patogeni non evolvono stratagemmi per aggirarla. Questo aspetto può essere gestito in tre modi, spiega Morgante.

Lo stacking consiste nell'inserire più geni di resistenza nella stessa pianta. In alternativa si possono piantare varietà con diversi geni di resistenza alternandole nel tempo o nello spazio. La terza soluzione è piantare varietà resistenti insieme a varietà non resistenti.

Stavolta la questione potrebbe essere più spinosa per le specie annuali, dove una nuova varietà di successo può essere adottata su larga scala in breve tempo.

Ma per la vite è impensabile che dall'oggi al domani vengano sostituiti tutti i vigneti tradizionali con nuove varietà resistenti

sostiene Morgante. Quindi la convivenza tra varietà resistenti e non resistenti ci sarà e questo permetterà di contrastare l'insorgenza di nuovi ceppi di patogeni in grado di farsi strada.

“I gruppi italiani lavorano su vitigni diversi, a seconda della loro localizzazione territoriale. Ad esempio, Chardonnay in Trentino e Glera nel Veneto per il

prosecco” ci dice Mario Pezzotti che dirige il Centro Ricerca e Innovazione della Fondazione Mach. I nomi dei geni di suscettibilità sono DMR6 per la peronospora e MLO per l'oidio.

“Il problema da risolvere è il passaggio chiave della rigenerazione, perché la mutazione viene indotta in una cellula pluripotente detta protoplasto e da quella si deve rigenerare l'intera pianta” - spiega il genetista che prima di arrivare a San Michele all'Adige ha lavorato a lungo all'Università di Verona.

Per la resistenza invece i geni provengono da specie selvatiche sessualmente compatibili, le stesse usate negli incroci per ottenere vitigni resistenti (che però in Italia perdono il marchio Doc perché non sono considerati della specie *Vitis vinifera*).

Finora sono stati isolati tre geni di resistenza, uno per oidio e due per peronospora, che non sono presenti nelle viti coltivate. Ma ne esistono altri potenzialmente utili contro questi due parassiti e si lavora per isolarli - aggiunge Pezzotti. La strategia è basata su genomica e trascrittomica comparative, ovvero sul confronto tra i genomi di vite sequenziati da capo a fondo (da telomero a telomero) e sul confronto tra gli insiemi dei loro trascritti.

E le altre malattie?

“C'è qualche gene identificato, ma ancora non sufficientemente caratterizzato, per la resistenza a patogeni minori come il fungo del marciume nero, che attacca il grappolo. Invece siamo molto indietro sulla flavescenza dorata, malattia molto seria causata da un fitoplasma, un piccolo batterio privo di parete che si annida nei vasi, e per il quale non sono noti geni di resistenza o di suscettibilità” - spiega Pezzotti. Insomma, c'è ancora molto lavoro da fare.

05

Editing genomico e sicurezza alimentare: banane resistenti

La continua diffusione di nemici biologici sta mettendo a rischio la sopravvivenza delle banane. I genetisti vegetali sono alla ricerca di una soluzione

di **Anna Meldolesi**

L'allarme sull'incombente estinzione delle banane è stato rilanciato insistentemente dai media nell'ultimo decennio. È stato coniato addirittura il neologismo "bananapocalisse". Quanto dobbiamo essere preoccupati? E cosa stanno facendo i genetisti vegetali per garantire lunga vita a questo frutto amato dai consumatori di tutto il mondo e celebrato da tanti artisti?

Dall'olio su tela di Paul Gauguin alla scultura deperibile di Maurizio Cattelan, dal gonnellino di Joséphine Baker al celebre "banana album" nato dalla collaborazione tra Andy Warhol e i Velvet Underground, questa bacca oblunga è diventata un'icona della nostra cultura.

Ma la posta in gioco è molto più che simbolica, perché l'industria della banana vale 8 miliardi di dollari all'anno. E ci sono circa 150 paesi tropicali e sub-tropicali in cui questo frutto rap-

presenta sia una cash crop che una staple crop. Ovvero una produzione da esportazione che sostiene il reddito dei piccoli coltivatori e anche un alimento base, che si consuma sia cotto che crudo e fornisce carboidrati, vitamine e minerali a milioni di persone.

L'attenzione internazionale si è concentrata, in particolare, sui destini della varietà che troviamo in tutti i negozi – la Cavendish – e sul suo nemico biologico numero uno: il *Fusarium oxysporum*. Un vecchio ceppo di questo fungo (TR1) ha decimato la varietà Gros Michel in voga fino agli anni '60 favorendo l'avvento della Cavendish che era resistente. Un altro ceppo di *Fusarium* detto TR4 ora minaccia quest'ultima, ma stavolta non disponiamo di varietà resistenti commercialmente appetibili pronte a sostituirla.

La produzione globale per ora ha retto, ma l'infezione viaggia inesorabilmente, trasportata con il terriccio che resta attaccato a scarpe, ruote, attrezzi. Dall'Asia la malattia è giunta in America Latina e anche in Mozambico, destando preoccupazione per l'intera Africa, poiché questo continente produce un terzo delle banane del mondo.

Si stima che nella regione dei grandi laghi, dove si trovano Burundi, Kenya, parte del Congo, Rwanda, Tanzania e Uganda, il consumo annuale pro-capite sia di 220–460 chilogrammi, quindici volte la media globale. In questi paesi le banane forniscono il 30–60% dell’apporto calorico giornaliero.

“Il TR4 è un problema globale e attacca la Cavendish, è quindi necessario trovare rapidamente una soluzione. Recentemente abbiamo iniziato a lavorarci con un piccolo finanziamento e siamo ottimisti, avremo i primi risultati alla fine del 2023” - ci dice Leena Tripathi dell’Istituto Internazionale di Agricoltura Tropicale di Nairobi, in Kenya. Il gruppo dell’II-TA fa parte della rete no-profit CGIAR e sta testando in serra dei banani in cui è stato disattivato un gene di suscettibilità grazie all’editing genomico.

Buone notizie arrivano anche dall’Australia, dove James Dale prima è riuscito a creare delle banane transgeniche resistenti al TR4, trasferendo un gene (RGA2) presente in una varietà selvatica (*Musa acuminata malaccensis*). Poi il genetista della Queensland University of Technology ha ottenuto lo stesso risultato con l’editing genomico riattivando il gene endogeno corrispondente, che era presente in stato dormiente.

Ma oltre alla regina delle varietà commerciali, esistono oltre un migliaio di varietà che non hanno la produttività e la palatabilità a cui siamo abituati, ma che potremmo iniziare ad apprezzare almeno in parte ampliando le nostre scelte alimentari. I loro frutti sono commercializzati per lo più localmente e impiegati in preparazioni alimentari diverse, dai dessert alla birra, e non si sa quante di queste cultivar siano vulnerabili al TR4.

Inoltre, è bene ricordare che non esiste solo il *Fusarium*: i parassiti e i patogeni che minacciano i banani sono molti tra microrganismi, nematodi e insetti. Se si adotta il punto di vista africano, in cima alla lista delle priorità c’è il batterio *Xanthomonas campestris*.

“Nel mio istituto stiamo lavorando su malattie batteriche e virali da molto tempo” - ci spiega Tripathi che recentemente ha pubblicato una rassegna sull’*International Journal of Molecular Sciences*. Sviluppare **banani resistenti** con i metodi tradizionali di incrocio è molto difficile, per la scarsa variabilità genetica del germoplasma disponibile, il lungo ciclo riproduttivo, la presenza di genomi multipli (poliploidia) e la sterilità di gran parte delle cultivar che sono propagate per via vegetativa.

Invece il sequenziamento completo e la disponibilità di un buon protocollo di trasformazione genetica rendono il banano un eccellente candidato per l’editing genomico.

Il risultato di cui Tripathi si dice più fiera sono le banane resistenti ai batteri ottenute con la tecnica CRISPR anche se ci tiene a precisare che si tratta di una prova di principio.

“Le nostre varietà non sono ancora pronte per il mercato. Abbiamo fatto buoni progressi ma servirà ancora qualche anno prima di tentare il debutto commerciale. Tra i geni presi di mira all’IITA contro lo *Xanthomonas* ci sono geni della suscettibilità, regolatori negativi delle difese della pianta, trasportatori di nutrienti.”

Per identificare i bersagli potenzialmente interessanti si paragonano i profili di espressione delle varietà resistenti e suscettibili esposte all’infezione (trascrittomica comparativa), oppure si consulta la letteratura scientifica su altre specie in cui possono essere presenti meccanismi molecolari simili. Un esempio del primo tipo è stato identificato nell’unica varietà resistente nota (*Musa balbisiana*), un esempio del secondo tipo è il gene della protezione dalla peronospora isolato nella pianta modello *Arabidopsis* (*MusaDMR6*).

Dal punto di vista scientifico esistono due strategie entrambe efficaci: mettere fuori uso un gene di suscettibilità o attivare un gene protettivo.

Ma per evitare problemi dal punto di vista regolatorio è preferibile che i prodotti finali siano liberi da DNA estraneo, perché la tendenza internazionale è quella di regolamentare in modo più leggero le piante che non contengono transgeni.

“Kenya, Nigeria e Malawi hanno già approvato linee guida sull’editing. Etiopia and Ghana sono in dirittura di arrivo”- afferma Tripathi.

Nuovi spunti per gli esperimenti del futuro potrebbero arrivare dall’analisi genetica di un numero crescente di varietà selvatiche e coltivate.

Uno studio recente ha svelato una parte ancora oscura della storia del banano, rivelando tre antenati precedentemente sconosciuti e forse ancora esistenti. I dati suggeriscono che siano originari rispettivamente di Nuova Guinea, Thailandia e dell’area tra Borneo e Filippine. Molto probabilmente non ci piacerebbe mangiare i loro frutti, perché prima della domesticazione le banane erano povere di polpa e piene di grossi semi, praticamente incommestibili. Ma scovando e studiando i lontani progenitori, gli esperti sperano di trovare un tesoretto di geni utili per mantenere le varietà moderne in salute.

06

La genetica vegetale e la lotta alla siccità

Per fronteggiare la crisi climatica, le piante hanno bisogno di una maggiore resistenza alla siccità. Nel corso degli anni, la ricerca scientifica ha adottato diverse strategie, grazie anche all'aiuto delle moderne tecnologie di editing genetico

di *Anna Meldolesi*

La resistenza alla siccità è uno degli obiettivi inseguiti con maggior determinazione dai genetisti vegetali. Una soluzione a portata di mano ancora non c'è ma il bilancio di tanti anni di ricerca è che esistono diversi percorsi che vale la pena continuare a esplorare. Se fosse possibile riassumere questo sforzo in un semplice slogan, le parole d'ordine sarebbero tre: testare, testare, testare.

La prima considerazione da fare è che le piante possono adottare diverse strategie per sopravvivere quando l'acqua scarseggia. Nel gergo tecnico si può distinguere tra resistenza alla siccità ed efficienza nell'uso delle risorse idriche. Oppure si può andare per il sottile parlando di “*drought avoidance*” (evitamento della siccità), “*drought escape*” (fuga dalla siccità) e “*drought tolerance*” (capacità di sopportazione dello stress idrico).

Un'altra premessa fondamentale è che la siccità può variare per **intensità** e **durata**, cosicché una pianta capace di tollerare uno stress moderato può soccombere comunque in condizioni più estreme. A complicare ulteriormente le cose c'è il fatto che, per essere adottate dagli agricoltori, le future varietà dovranno dimostrarsi non solo più **resilienti** ma anche altrettanto **produttive** delle varietà che vogliono sostituire.

All'Università di Milano si perseguono due strategie con l'aiuto della tecnica di editing genetico CRISPR. La prima ricade nella tipologia dell'avoidance e mira a ridurre la traspirazione socchiudendo gli stomi, ovvero i pori che sono presenti sulla superficie delle foglie e sono adibiti agli scambi gassosi. La seconda punta ad anticipare la fioritura, per fruttificare prima dell'arrivo dei mesi più secchi, ed è considerata una forma di escape.

Lucio Conti è coinvolto in entrambi i filoni e gli abbiamo chiesto di fare il punto sullo stato dell'arte.

“La storia della nostra ricerca sulla regolazione degli stomi nasce molti anni fa da studi eseguiti sulla pianta modello *Arabidopsis thaliana* e ora prosegue sul pomodoro nell'ambito del Progetto Biotech finanziato dal Ministero dell'agricoltura” - ci dice Conti.

I ricercatori diretti da Chiara Tonelli avevano identificato un fattore di trascrizione espresso nella coppia di cellule che regolano l'apertura degli stomi ma non nelle altre parti della pianta. Dunque, avevano buone ragioni per sperare che reprimendolo non si sarebbero verificate interferenze con altri processi fisiologici.

“Il gene si chiama MYB60 ed è un bersaglio interessante perché, quando viene inattivato con una mutazione, la pianta traspira meno, risparmia acqua e può resistere meglio in condizioni di siccità”, spiega Conti. I pori non si chiudono del tutto e questo è un bene, perché una riduzione drastica degli scambi gassosi comprometterebbe le performance della pianta. Fortuna vuole che il gene sia stato trovato anche in altre specie dicotiledoni, ad esempio in vite, tabacco e pomodoro, e che nel frattempo sia diventato più facile modificare i genomi, grazie a CRISPR. “Questo ha permesso a Massimo Galbiati e a me di generare piante di pomodoro con delezioni diverse.”

Avere linee di piante con mutazioni differenti consentirà di scegliere le migliori continua Conti. La selezione è in corso e le prime osservazioni in serra appaiono promettenti, ma solo in primavera sarà possibile raccogliere dati affidabili sulla resistenza alla siccità in condizioni controllate.

“Sarebbe importante fare anche le prove in campo, perciò è auspicabile che vengano sbloccate al più presto le autorizzazioni per la sperimentazione con piante geneticamente modificate” - commenta Chiara Tonelli, che è stata nominata presidente della Federazione Italiana Scienze della Vita. Le specie vegetali hanno **necessità idriche** differenti ed è un peccato che nei **cereali** non sia stato trovato l'equivalente del MYB60. I numeri ce li dà Tonelli: Per ottenere un pomodoro servono 13 litri di acqua, per una mela 70 litri, per un chilo di mais, grano e riso sono necessari rispettivamente novecento, mille e tremila litri.

L'agricoltura consuma il 70% dell'acqua dolce, in confronto gli usi domestici e l'industria ne impiegano l'8 e il 22%, ricorda la genetista.

La siccità è la prima causa della perdita di produzione, è causa di migrazioni e conflitti. Insomma, è importante sviluppare piante che siano in grado di crescere bene in condizioni di scarsità idrica ma anche in condizioni normali, perché non è possibile sapere se un anno sarà più o meno siccitoso

conclude Tonelli.

Un'idea consiste nel rendere le piante più reattive ai primi segni di stress idrico agendo su alcuni ormoni vegetali.

“In caso di siccità l'acido abscissico o ABA è il segnale chimico per eccellenza e noi vorremmo intervenire su questa cascata di segnale. Disattivando gli elementi genici che la frenano, si potrebbero avere piante sensibilizzate e dunque più pronte ad attivare strategie difensive” - spiega Conti. I geni coinvolti sono tanti, quindi sarà necessario studiarli uno per uno e in combinazioni diverse, nella speranza di trovare il giusto equilibrio tra capacità di reazione e buona crescita. La via dell'ABA influenza molti processi oltre alla regolazione degli stomi, tra cui il timing della fioritura a cui Conti è particolarmente interessato. È uno dei tratti più importanti, perché se la fioritura è programmata entro una certa finestra temporale la pianta può produrre semi prima che arrivi la siccità.

In pratica si tratta di comprimere la fase riproduttiva nella stagione più piovosa, giocando di anticipo sui mesi più secchi. Non è detto, però, che quello che funziona per *Arabidopsis* possa essere applicato alle specie di interesse agrario, che hanno perso parte della loro plasticità proprio per la selezione fatta finora.

“È emblematico lo studio del francese François Tardieu, che ha confrontato le varietà di mais coltivate in 50 anni e più. Ne emerge che i breeder sono intervenuti su caratteri costitutivi come la fioritura e l'architettura delle foglie, ma non sulla regolazione degli stomi che poteva risultare svantaggiosa per la produttività in uno scenario finora relativamente favorevole” - dice Conti. Ora però la crisi climatica incombente sta cambiando il rapporto tra costi e benefici per questo e altri tratti, come l'aumento consistente della massa radicale innescato dal gene DRO1 (un'altra strategia di *avoidance*).

“Ci stanno lavorando diversi gruppi perché avere radici più sviluppate consente di raggiungere l'acqua in profondità, anche se investire in radici è un costo per la pianta e il vantaggio viene meno se il suolo è poco profondo” - afferma Conti.

Insomma, la tolleranza alla siccità è un carattere, o meglio un insieme di caratteri, estremamente complesso, e bisognerà esplorare molte possibilità prima di trovare stratagemmi efficaci. In passato i ricercatori hanno giocato le carte del breeding classico e anche dell'ingegneria genetica, ma le varietà resistenti agli stress idrici arrivate sul mercato si contano sulle dita di una mano. La speranza è che la maggior consapevolezza della sfida rappresentata dai cambiamenti climatici e l'avvento di uno strumento versatile come l'editing genomico contribuiranno ad accelerare la ricerca e a concretizzarne i risultati.

07

Domesticazioni delle piante selvatiche nell'era genomica

Il processo di domesticazione delle piante selvatiche e, quindi, il numero di specie vegetali coltivate su larga scala potrebbe subire in pochi anni un'importante accelerazione grazie alle nuove tecnologie come l'editing genetico

di **Anna Meldolesi**

Le specie vegetali coltivate su larga scala nel mondo sono circa 150 ma questo numero potrebbe aumentare, anche notevolmente. Infatti si stima che le piante che sono state pienamente domestiche nel corso di dodicimila anni siano 250, mentre ne esistono settemila semi-domestiche e le edibili sarebbero addirittura cinquantamila. La sfida appare enorme e lo è, ma per le futuribili domesticazioni dell'era genomica potrebbero non essere necessari secoli e millenni, come accadeva agli albori dell'agricoltura. Il processo potrebbe avvenire a ritmo accelerato, nel giro di pochi anni, sfruttando le conoscenze accumulate sui tratti utili per la coltivazione e le nuove tecnologie come l'editing genetico.

Le piante coltivate hanno performance agronomiche ottimizzate grazie alla domesticazione e al breeding. Le selvatiche no, perciò i raccolti che offrono sono

scarsi e faticosi da recuperare. Ma le seconde possono custodire tratti che vale la pena reintrodurre nelle prime, come la resistenza alle malattie o agli stress ambientali.

“L'approccio classico consiste nel trasferire alle specie coltivate i tratti selvatici utili. L'alternativa è rendere coltivabili le piante selvatiche di interesse, trasferendo caratteristiche genetiche chiave per la resa” - ci spiega Silvio Salvi dell'Università di Bologna.

La prova di principio che l'alternativa funziona, e in alcuni casi potrebbe rappresentare la strada più semplice, è arrivata nel 2018, con due lavori pubblicati su *Nature Biotechnology*. Entrambi i gruppi hanno dimostrato che è possibile domesticare “*de novo*” e in modo “*fast forward*” il parente selvatico del pomodoro (*Solanum pimpinellifolium*) ricorrendo all'editing (Domestication of wild tomato is accelerated by genome editing e De novo domestication of wild tomato using genome editing). Sempre nello stesso anno è stata dimostrata su *Nature Plants* la domesticazione dell'alchechengi (*Physalis pruinosa*), una pianta del centro e sud America difficile da coltivare ma apprezzata per le sue deliziose bacche arancioni. In seguito a questi risultati è partito uno sforzo internazionale per ri-domesticare i parenti selvatici di alcune delle colture più importanti per l'alimentazione globale, a cominciare dal riso. Un gruppo cinese, in particolare, ha annunciato su *Cell* di aver introdotto nella specie *Oryza alta* sei tratti agronomicamente rilevanti - dalla ridotta dispersione dei semi alla forma della pannocchia - grazie

all'aiuto di CRISPR.

“Sviluppare nuove piante adatte alla coltivazione è interessante dal punto di vista scientifico, ma è soltanto l'inizio” - commenta Salvi. Non è detto che gli exploit di laboratorio diventino successi commerciali: sta ai produttori decidere se coltivare nuove piante e ai consumatori decidere se metterle in tavola. Oggi, ad esempio, consumiamo un'enorme quantità di patate, che trecento anni fa erano guardate ancora con sospetto da molti agricoltori europei. I kiwi, d'altra parte, hanno iniziato a essere commercializzati in Nuova Zelanda intorno al 1930 e in meno di un secolo hanno conquistato il mondo. Probabilmente la fortuna della nuova strategia dipenderà soprattutto dalla scelta più o meno azzeccata delle piante selvatiche o semi-domesticate su cui lavorare.

La domesticazione di piante perenni imparentate con specie annuali di largo consumo potrebbe avere un impatto molto positivo dal punto di vista ambientale

commenta Salvi. Se invece di seminare ogni anno lo si potesse fare ogni cinque o sei, per le industrie sementiere non sarebbe un affare ma si ridurrebbe l'erosione del suolo.

“Servirebbe un grande progetto, anche nazionale” - nota Salvi. In pratica invece di cercare di rendere perenni i cereali annuali che coltiviamo da migliaia di anni, si tratterebbe di rendere coltivabili i progenitori selvatici che sono già perenni, come il

teosinte per il mais. In Italia, in particolare, esiste un frumento selvatico (*Dasypyrum villosum*) che cresce ai margini dei campi e occasionalmente si incrocia con il frumento duro.

“Ha semi minuscoli, alletta e ha le spighe fragili, ma potrebbe diventare coltivabile intervenendo geneticamente sulla taglia della pianta e del seme” - ci dice Salvi sottolineando che potrebbe portare in dote dei geni per la resistenza alle malattie, ma che per ora la sua è soltanto un'idea. Tra le piante selvatiche addomesticabili, inoltre, potrebbe nascondersi qualcosa di simile a una nuova rucola, un tipo di insalata che nel giro di pochi anni ha sedotto palati e mercato.

Per ora il genetista bolognese lavora a rendere coltivabile il grespino (*Sonchus oleraceus*) un lattughino spontaneo già usato per le misticanze nel sud Italia e in altre aree del Mediterraneo. Per trasformarlo in una “crop” vera e propria bisognerà uniformare la germinabilità dei semi e controllare la fioritura, che sottrae sostanze nutritive alle foglie rendendo la lattuga meno appetibile. Il programma europeo in cui si inserisce questo progetto, però, non prevede il ricorso all'editing, quindi si dovrà procedere più lentamente, a forza di incroci.

Il gruppo di Salvi lavora da un decennio anche su una pianta da biomassa (*Arundo donax*). Questa canna comune si distingue per la sua capacità di accumulare carbonio e, una volta domesticata (per esempio negli aspetti che riguardano la moltiplicazione delle piante), potrebbe essere coltivata su terreni marginali per fornire biomassa per usi energetici. Esiste un precedente di questo tipo: il miscanto. Questa specie è già stata resa coltivabile da un consorzio pubblico-privato britannico, in un'ottica di economia circolare, ma non ha ancora pienamente soddisfatto le aspettative commerciali.

08

L'editing genomico per combattere povertà e malnutrizione

L'*Innovative Genomics Institute-IGI*, istituto fondato dal premio Nobel Jennifer Doudna, e il CGIAR, Gruppo consultivo per la ricerca agricola internazionale, sfruttano il potenziale dell'editing genomico per contrastare povertà e malnutrizione nei paesi a basso e medio reddito.

di **Anna Meldolesi**

L'editing genomico è una tecnologia economica e versatile, alla portata dei centri di ricerca no-profit dei paesi in via di sviluppo. Si rivelerà uno strumento utile per aiutare tanti piccoli agricoltori a rompere il cerchio della povertà e per migliorare la salute delle popolazioni ancora afflitte da fame e malnutrizione?

Il potenziale c'è, ne sono convinti al CGIAR, il consorzio che riunisce quindici istituti di ricerca agraria sparsi per il globo, lo stesso che nel secolo scorso è stato il fulcro della Rivoluzione verde. E ne sono convinti anche all'IGI, l'istituto dedicato alla genomica innovativa fondato dalla Premio Nobel Jennifer Doudna, la co-inventrice di CRISPR. Questi due soggetti – che simboleggiano l'impegno per lo sviluppo rurale del sud del mondo da una parte e la migliore scienza di frontiera dall'altra – hanno siglato un ac-

cordo di collaborazione della durata di cinque anni¹.

Si stima che a livello globale una persona su quattro non possa permettersi una dieta sana, ma l'innovazione genetica potrebbe aiutare anche loro, attraverso lo sviluppo di piante resistenti alle malattie, tolleranti agli stress, ricche di nutrienti, sostenibili, adatte alle necessità dei paesi a basso e medio reddito.

La partnership si è già concretizzata nella prima prova in campo, avviata presso uno dei centri del CGIAR, l'*International Center for Tropical Agriculture* con base in Colombia. Si tratta di varietà di riso in cui sono stati modificati due geni che influenzano il numero dei pori presenti sulla superficie delle foglie². Secondo Andy Murdock, che è la voce ufficiale dell'IGI, il trial servirà a verificare se i buoni risultati preliminari valgono anche nel mondo reale. Ovvero e una modesta riduzione della densità degli stomi è sufficiente ad abbassare il fabbisogno idrico del riso senza danneggiare le rese.

La lista degli obiettivi che il CGIAR è interessato a perseguire con l'aiuto dell'editing, comunque, è lunga ed è stata pubblicata su *Nature Genetics*³. Oltre al riso resiliente agli stress climatici figurano banani, mais, grano, patate e yam resistenti alle malattie, ma anche il miglioramento della cassava sotto il profilo nutrizionale e ambientale. Altre piante di interesse sono miglio, sorgo e fagioli, mentre i tratti da editare vanno dalla digeribilità alla riduzione degli sprechi, dalla riproduzione asessuata (apomissia) alla resistenza alle piante parassite.

Kevin V. Pixley è il direttore del programma per le risorse genetiche del CIMMYT, il centro specializzato in mais e grano con base in Messico. Ma quando gli abbiamo chiesto quale fosse il suo progetto di editing preferito in via di sviluppo al CGIAR ha scelto le arachidi. L'idea è di ridurre il contenuto di alcune sostanze tossiche dette aflatossine, che spesso eccedono i limiti di sicurezza nei mercati africani.

“Sono un grave problema sanitario, danneggiano lo sviluppo fisico e mentale dei bambini e impediscono ai produttori locali di migliorare il proprio reddito con le esportazioni” - dice Pixley.

Se l'editing genomico funzionasse per le arachidi la soluzione potrebbe essere applicata anche ad altre piante come mais e sorgo che sono minacciati anch'essi dalle aflatossine.

Risolvere i problemi scientifici, però, non basterà, bisognerà superare anche gli ostacoli brevettuali e regolatori.

“Sono entrambe questioni importanti, ma la proprietà intellettuale può essere negoziata e in molti casi, soprattutto quelli commercialmente meno appetibili, può essere ottenuta a costo zero” - sostiene Pixley.

Le questioni regolatorie possono essere più gravi, perché potrebbero tradursi in limitazioni al commercio, ad esempio se alcuni paesi chiudessero le porte ai cereali con il genoma editato.

Se i prodotti dell'editing venissero regolamentati allo stesso modo degli OGM, le piante editate potrebbero essere penalizzate non solo nei paesi che adottano queste regole ma anche in quelli interessati ad esportare in quei mercati. I paesi ricchi, dunque, hanno anche questo tipo di responsabilità nei confronti dei paesi a reddito medio e basso.

Per finire abbiamo chiesto a Pixley di spiegare la filosofia e l'impatto del CGIAR rivolgendosi direttamente ai lettori italiani. La sua risposta riguarda i poveri del mondo ma arriva a interessare anche noi:

“Lavoriamo per assicurare che ogni agricoltore e ogni consumatore abbiano accesso ai benefici potenziali che le scienze agrarie hanno da offrire. Poterlo fare dovrebbe essere un diritto e non un privilegio riservato a chi può pagare.

Il CGIAR è una rete di sicurezza per i nuovi patogeni e per i cambiamenti climatici che minacciano la sicurezza alimentare e nutrizionale. È molto probabile che dalle ricerche svolte sulle linee di mais e grano sviluppate negli ambienti tropicali di Messico, Kenya, Bangladesh, o in un altro paese in cui il CGIAR è presente, arriveranno soluzioni utili anche per i futuri problemi del mais e del grano italiani.”

¹ <https://www.cgiar.org/news-events/news/harnessing-the-power-of-science-to-reduce-poverty-and-malnutrition/>

² <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.12.21.473329v1>

³ https://www.nature.com/articles/s41588_022_01046_7

09

Ultime frontiere della genomica in agricoltura: l'apomissia

Ingegnerizzando in specie fondamentali per l'alimentazione umana la capacità di produrre semi in maniera asessuale diventa possibile riseminare i raccolti. Ora che questo traguardo è stato raggiunto nel riso abbiamo chiesto a Emidio Albertini dell'Università di Perugia di illustrarci sfide e prospettive.

di **Anna Meldolesi**

Per molto tempo è stata soltanto una curiosità botanica, capace di interessare pochi studiosi appassionati di tassonomia ed evoluzione. Oggi è diventata il Santo Graal della genetica agraria. Parliamo dell'apomissia, la riproduzione asessuale per seme, ovvero la capacità di produrre semi vitali del tutto identici alla pianta madre, affrancandosi dalla necessità della fecondazione.

“La ricerca ha avuto un andamento a onde, ora siamo sulla cresta” - ci dice Emidio Albertini, esperto di apomissia dell'Università di Perugia e organizzatore di un recente workshop sul tema nell'ambito della Plant & Animal Genome Conference (San Diego, 13 gennaio 2023).

L'umore tra gli addetti ai lavori è alto e il traguardo non è mai apparso così vicino, soprattutto grazie ai brillanti risultati annunciati su Nature Communica-

tions il 27 dicembre 2022 da un gruppo franco-statunitense.

Con l'aiuto della tecnica CRISPR, Venkatesan Sundaresan dell'Università della California a Davis e i suoi colleghi hanno raggiunto un'efficienza altissima nell'ingegnerizzazione dell'apomissia in una specie fondamentale per l'alimentazione umana: il riso.

Come ci sono riusciti e quali ostacoli restano da superare? Quali saranno le prossime specie? Le domande che abbiamo fatto al genetista umbro sono molte, ma è bene partire dalla più importante: quanto è grossa la posta in gioco?

L'apomissia è un carattere presente in circa 400 specie selvatiche e la sua evoluzione è ancora dibattuta. Non è chiaro cosa sia venuto prima: la riproduzione per seme con o senza sesso? - premette Albertini.

Riprodurre questo fenomeno naturale nelle piante più importanti dal punto di vista agronomico, comunque, avrebbe conseguenze potenzialmente rivoluzionarie.

Quando ci saremo riusciti per i breeder sarà più facile fissare le combinazioni genetiche superiori, adattandole ai diversi contesti. Inoltre, i coltivatori

potranno riseminare ogni anno parte del raccolto, ottenendo piante uniformi per qualità e resa, generazione dopo generazione.

I benefici economici potrebbero aggirarsi sui miliardi di euro e i primi a trarne vantaggio potrebbero essere i piccoli agricoltori dei paesi in via di sviluppo che oggi non possono permettersi di acquistare le sementi ogni anno.

“Non tutti sanno che molte varietà sono commercializzate sotto forma di ibridi, che danno il meglio nella prima generazione ma poi producono una progenie altamente variabile a causa del rimescolamento dei geni che avviene nella riproduzione sessuale” - spiega Albertini. L'apomissia serve a generare piante che sono cloni della pianta madre, perciò risolverebbe magicamente il problema, abbassando i costi di produzione del seme e consentendo di riseminare il raccolto.

Com'è nata questa idea? La storia degli studi sull'apomissia inizia nel lontano 1829 ai *Kew Gardens* di Londra, lo stesso luogo in cui è ambientato il techno-thriller “*Apomixis*” di Peter Pringle (il titolo originale è “*Day of the Dandelion*”, perché il tarassaco è una pianta apomittica). Il primo curatore dei prestigiosi giardini botanici inglesi si accorse che tre esemplari femminili di un arbusto australiano simile all'agrifoglio (*Alchornea ilicifolia*) producevano seme in assenza di polline.

“Nel 1869 anche Mendel si è imbattuto nel fenomeno senza saperlo, facendo incroci con la specie *Hieracium pilosella*, ma la spiegazione dei risultati ottenuti in questi esperimenti ha richiesto altri 40 anni” - racconta Albertini. In seguito, il carattere è stato trovato in molte altre piante, sia mono che dicotiledoni, e un manipolo di genetisti ha cercato di

trasferirlo nelle specie di interesse attraverso gli incroci, ma questa strada si è rivelata un vicolo cieco. Ben più fruttuoso, in confronto, è stato il lavoro di mappatura delle vie molecolari dell'apomissia, alla ricerca dei pulsanti genetici per passare da un tipo di riproduzione all'altro. Una volta trovati i geni chiave sono iniziati gli esperimenti per trasferirli, con l'ingegneria genetica prima e l'editing genomico poi. Emidio Albertini lavora, insieme a Lucia Colombo dell'Università di Milano, con il gene *Apostart*.

“abbiamo studiato nella pianta modello *Arabidopsis* e in futuro pensiamo di provare con il riso” - ci dice. La company olandese *Keygene* si concentra sul gene *Par*. Il fiore all'occhiello della Francia, invece, è il sistema *MiMe*, che è composto da tre geni (la sigla indica che la mitosi prende il posto della meiosi, dunque la cellula uovo mantiene l'intero corredo cromosomico anziché dimezzarlo come avviene solitamente nelle cellule sessuali). Questi gruppi e altri ancora partecipano a due grandi progetti finanziati dall'Unione europea, denominati rispettivamente *MAD* e *Polyloid* e incentrati proprio sulle piante apomittiche.

Un balzo in avanti decisivo è stato compiuto dal gruppo statunitense guidato da Sundaresan nel 2019, con la descrizione su *Nature* dello sviluppo di linee di riso apomittiche per il 40% circa.

La ricetta prevedeva due step: prima il riso è stato ingegnerizzato con un gene che consente agli embrioni di svilupparsi senza fecondazione (*Baby Boom1*), poi la piattaforma di editing *CRISPR* è

servita a introdurre il sistema MiMe eliminando la meiosi. Il bello è che l'effetto è stato mantenuto per almeno otto generazioni, dunque il DNA continua a esprimersi correttamente anche senza il contributo paterno. L'ultima novità è che la **percentuale di successo** dell'apomissia è stata **alzata al 95%** sincronizzando le due azioni in un'unica mossa. In pratica CRISPR ha permesso di trasferire simultaneamente nello stesso pacchetto i quattro geni (*BabyBoom* più i tre di MiMe).

Il traguardo è vicino ma non ancora pienamente raggiunto, precisa Albertini:

Prima di pensare alla commercializzazione resta da risolvere il problema del grain-filling.

In effetti il riso apomittico descritto su *Nature Communications*, quando viene coltivato in serra, tende a produrre un certo numero di semi "sgonfi", in cui non si avvia correttamente la formazione dell'endosperma. Bisognerà capire se la colpa è della linea ibrida di partenza o della bassa penetranza del pacchetto di geni.

Intanto l'Università di Davis ha avviato le prime sperimentazioni in campo con il riso apomittico e i ricercatori stanno mettendo alla prova un sistema simile su altre due specie.

"Sundaresan mi ha detto che hanno scelto sorgo e vigna, due specie per le quali è complesso produrre ibridi. I semi della vigna assomigliano a fagioli, si tratta di una pianta che cresce anche sul Lago Trasimeno ma è importante soprattutto per i paesi in via di sviluppo" - spiega il genetista italiano, ricordando che il progetto è finanziato dalla Fondazione Gates.

La mia ultima domanda riguarda i tempi di attesa

per il debutto sul mercato:

"Noi che abbiamo vissuto la controversia degli OGM e poi abbiamo visto nascere CRISPR, faremo in tempo a mangiarci un risotto apomittico?"

Albertini è cautamente ottimista:

"Prima dell'ultimo exploit avrei detto di no, adesso però inizio a crederci. Forse dovremo andare a mangiarlo negli Stati Uniti, che hanno tecnologie avanzate, fondi generosi e norme favorevoli."

10

L'editing vegetale per la ricattura dell'anidride carbonica

Per contrastare l'accumulo di gas serra nell'atmosfera, i genetisti lavorano al potenziamento della capacità di cattura di alcune coltivazioni

di **Anna Meldolesi**

Ridurre drasticamente le emissioni di gas serra è indispensabile, ma non basta. Per contenere l'impatto della crisi climatica bisognerà anche ripulire l'atmosfera, almeno parzialmente, dall'anidride carbonica emessa. La prima buona notizia è che le piante fanno questo per natura, attraverso la fotosintesi: usano l'energia solare per fissare la CO₂ producendo zuccheri. La seconda è che è stato avviato un ambizioso programma scientifico finalizzato a potenziare, con l'aiuto dell'editing genomico, sia la capacità di cattura che di immagazzinamento della CO₂ in alcune specie di interesse agrario, a cominciare da sorgo e riso.

Questa ricerca di frontiera ha il suo baricentro presso l'IGI, l'Istituto per la Genomica Innovativa fondato da Jennifer Doudna, premio Nobel e co-inventrice della tecnica CRISPR, e coinvolge il *Lawrence Livermore National Laboratory* oltre a gruppi dell'Università della California a Berkeley e a Davis.

Per avviare la sfida i ricercatori possono contare su undici milioni di dollari stanziati dall'organizzazio-

ne filantropica di Mark Zuckerberg e di sua moglie Priscilla Chan.

L'iniziativa è stata annunciata nel giugno 2022, ma poggia le basi su filoni di ricerca che erano già in corso all'IGI e hanno già prodotto le prime pubblicazioni, come ci ha spiegato il direttore della comunicazione Andy Murdock. Tra questi lavori ce ne sono alcuni che mirano a rendere la fotosintesi più efficiente, in modo da rimuovere più anidride carbonica (si veda ad esempio lo studio di David Savage sull'enzima Rubisco e quello di Kris Niyogi sui tempi della fotoprotezione). La cattura però rischia di servire a poco, se la CO₂ è destinata a tornare rapidamente in atmosfera.

Un passo avanti per favorirne l'immagazzinamento sottoterra è il lavoro di Peggy Lemaux, che ha affinato le tecniche necessarie per editare geneticamente il sorgo. L'obiettivo è decifrare le caratteristiche genetiche delle sue profonde radici, svilupparne varietà potenziate e poi ispirare analoghi miglioramenti in altre piante coltivate su larga scala.

C'è poi una terza area di ricerca, ancora più pionieristica, che riguarda l'ultima tappa del viaggio del carbonio dalle foglie, alle radici fin dentro al terreno. Intervenedo sui microrganismi del suolo perché incorporino il carbonio in aggregati stabili, infatti, si spera di allungare la durata dell'immagazzinamento sull'arco dei decenni. In questo settore

nascente eccelle Jill Banfield, ideatrice di un sistema per l'editing delle comunità microbiche.

Un altro progetto per la ricattura, la Harnessing Plants Initiative, è stato avviato sempre in California, al Salk Institute, con 30 milioni stanziati da un altro magnate, Jeff Bezos. In cosa si differenziano i due approcci?

“Il lavoro dell’IGI e quello del Salk sono complementari; infatti, la nostra Pamela Ronald contribuisce anche al loro programma per aumentare l’immagazzinamento sotterraneo nelle masse radicali” - spiega Murdock. L’approccio finanziato dai coniugi Zuckerberg però è di più ampio respiro:

“Cerchiamo di ottimizzare la fotosintesi per accrescere la biomassa aerea, di migliorare l’architettura radicale e gli essudati nel suolo, e poi di lavorare con i microbiomi per un effetto di lungo termine.”

Ristabilire il carbonio del suolo, dopo che è stato consumato dall’agricoltura intensiva, potrebbe portare anche altri benefici per l’ecologia del terreno. Le stesse piante, ovviamente, dovranno soddisfare le necessità di agricoltori e consumatori, se si vuole

La sfida è enorme e gran parte delle correzioni genetiche che appariranno promettenti in laboratorio e in serra, probabilmente, deluderanno le attese nelle prove in campo. Ma a differenza che nel passato ora dispo-

niamo di tecniche come CRISPR che consentono di testare innumerevoli idee in combinazioni diverse finché non se ne troverà qualcuna in grado di reggere la complessità del mondo reale.

Ronald, per esempio, ha intenzione di passare in rassegna migliaia di mutanti di riso alla ricerca di tratti radicali benefici.

L’agricoltura contribuisce pesantemente ai cambiamenti climatici con le sue emissioni, riuscirà a diventare parte della soluzione al problema? Secondo i ricercatori, in gioco ci sono oltre un miliardo di tonnellate di CO₂ ricatturabili con l’aiuto dell’editing, ma a sviluppare bene i calcoli dovrà pensarci il Lawrence Livermore *National Laboratory*. Quel che conta, comunque, è che climatologi e genetisti vegetali stiano iniziando a collaborare.

“L’idea di usare l’editing genomico per la cattura del carbonio è piuttosto nuova e ha cominciato ad attirare l’attenzione solo recentemente” - premette Murdock. Ma il dialogo tra discipline che sono solo apparentemente lontane è partito.

Gli scienziati del clima sono interessati a tutti gli strumenti che possono aiutare la lotta alla crisi climatica e siamo incoraggiati dall’interesse che abbiamo ricevuto in così poco tempo.

Se n’è parlato anche all’ultimo summit internazionale sul clima, la COP27 che si è tenuta in Egitto nel novembre 2022, nel contesto delle iniziative che hanno coinvolto l’Agriculture *Innovation Mission for Climate*, l’alleanza nata per promuovere l’agricoltura “*climate smart*”.

11

Frumento a basso contenuto di acrilammide grazie all'editing genomico

La tecnica di editing genomico CRISPR può essere utilizzata in agricoltura per ridurre il contenuto di asparagina, un aminoacido naturalmente presente nei prodotti contenenti amido che durante la cottura genera un composto potenzialmente cancerogeno per l'uomo, l'acrilammide

di **Anna Meldolesi**

Caffè, cereali per la colazione, biscotti. Pane tostato, cracker e snack di ogni tipo. Torte dolci e salate, pastella per friggere, patate fritte e al forno. La lista degli alimenti che contengono acrilammide è lunga e appetitosa. Il problema è che questa sostanza è potenzialmente cancerogena e si forma, durante la cottura ad alte temperature, da precursori presenti naturalmente in cereali, tuberi e altri vegetali. La soluzione, dunque, potrebbe essere il ricorso all'editing genomico per ridurre la presenza di uno di questi precursori: l'aminoacido asparagina. Il sapore di abbrustolito deriva dall'interazione tra asparagina libera e zuccheri riducenti, durante la frittura o la tostatura, nel forno o sulla griglia, e anche durante le lavorazioni industriali a oltre 120 gradi. La scoperta che il prodotto di questa reazione, l'acrilammide, è un contaminante alimentare comune risale al 2002 e ha messo in allarme le agenzie regolatorie.

Nel 2015 l'European Food Safety Authority-EFSA ha pubblicato la sua prima valutazione, concludendo che l'acrilammide aumenta potenzialmente il rischio di sviluppare il cancro nei consumatori di tutte le fasce d'età.

“Sappiamo che è cancerogena nei roditori e che causa anche altri problemi, per sviluppo e fertilità” - spiega Nigel Halford che lavora in uno dei centri più importanti per la ricerca agraria internazionale, la *Rothamsted Research* in Inghilterra. Restare sotto alle soglie indicate dalla Commissione europea per i vari alimenti sarà una sfida difficile in assenza di innovazione genetica.

Per le industrie alimentari la questione è scottante, ma rimediare dovrebbe essere possibile grazie all'espedito genetico messo a punto proprio alla *Rothamsted Research*. Dopo gli studi incoraggianti in laboratorio e in serra Halford conferma una buona performance anche nel test che conta di più: la sperimentazione in campo (i risultati del primo anno sono in corso di pubblicazione).

“Il grano ha cinque geni che codificano per l'asparagina sintetasi, l'enzima che sintetizza l'asparagina. Uno di questi è particolarmente attivo nei chicchi e dunque è un bersaglio ideale” - spiega il genetista.

Inattivando questo gene detto ASN2 con la tecnica CRISPR si ottengono piante che crescono bene ma sono più sicure da

mangiare, perché contengono abbastanza asparagina da incorporare nelle proteine di cui c'è bisogno ma, rispetto alle piante non editate che fungono come controllo, hanno un livello quasi dimezzato dell'aminoacido solubile.

L'asparagina, infatti, diventa problematica solo quando si trova in forma libera e può partecipare alla reazione nociva.

La mutazione mirata generata dai ricercatori inglesi è una semplice delezione che inattiva il gene bersaglio, e vale la pena notare che è del tutto simile alle mutazioni naturali trovate in alcuni parenti selvatici del grano. Quindi, una volta eliminate con gli incroci tutte le tracce dell'intervento genetico, le piante editate non dovrebbero essere regolamentate come OGM in un numero crescente di paesi, tra cui Stati Uniti, Argentina, Brasile, Giappone e in futuro probabilmente anche in Gran Bretagna, che dopo la Brexit ha avviato una revisione del quadro regolatorio in senso più permissivo.

Per le patate esiste già una variante a basso contenuto di acrilammide ma è transgenica e difficilmente verrà commercializzata fuori dagli USA. In confronto ci si aspetta che l'editing genetico possa essere accolto meglio sia dai regolatori che dai consumatori.

Verrà impiegato per ridurre il rischio acrilammide anche negli alimenti diversi dal grano?

“So che alcuni gruppi, in Australia e in Svezia, stan-

no lavorando sulle patate con approcci di editing diversi tra loro. Per quanto riguarda il caffè, se ci sono ricerche in corso non sono state rese pubbliche” - ci dice Halford. Lui comunque ha scelto un altro obiettivo su cui lavorare, per conferire una seconda qualità desiderabile al suo grano a basso contenuto di asparagina:

Vorremmo usare nuovamente l'editing sulle stesse piante, questa volta non per eliminare un contaminante ma per aumentare il contenuto di una sostanza utile. Si tratta della lisina, un aminoacido essenziale che dobbiamo introdurre con la dieta e di cui i cereali sono carenti.

12

Editing genomico con grafting: è possibile avere piante editate interamente non-OGM?

Dall'incontro tra le forbici genetiche CRISPR e l'antica pratica degli innesti nasce l'editing by grafting, cioè l'idea di correggere il genoma impiegando un tipo di CRISPR mobile, capace di spostarsi dalla parte radicale alla parte aerea innestata, che è a tutti gli effetti OGM-free

di **Anna Meldolesi**

La pratica degli innesti è antichissima, ne scriveva già Catone il censore oltre duemila anni fa. Le forbici genetiche CRISPR/Cas9 (abbreviate in CRISPR) invece sono un'invenzione giovane, che apre una porta sul futuro. Dall'incontro tra le due tecniche potrebbe sbocciare la soluzione a un problema cruciale, da cui dipende l'accettazione pubblica della più importante delle Tecnologie di evoluzione assistita: come ottenere facilmente piante geneticamente corrette (in gergo si dice editate) e al tempo stesso ripulite da ogni traccia di DNA estraneo, che possano essere considerate e regolamentate in modo diverso dagli OGM.

L'“*editing by grafting*”, ovvero l'idea di correggere il genoma usando un portainnesto, presuppone l'impiego di un tipo di CRISPR mobile, capace di spostarsi dalla parte radicale (che ospita il gene estraneo necessario a produrre le forbici genetiche) alla parte aerea innestata (che invece è OGM-free). In accordo con le leggi di Mendel, il 25% dei semi prodotti avranno entrambe le copie del gene di interesse corrette secondo le istruzioni impartite dai ricercatori. Insomma, risulteranno editati senza essere mai stati esposti a DNA estraneo e daranno origine a piante editate interamente non-OGM (a questo link è disponibile un'animazione che illustra il concetto).

Editing genomico con grafting e CRISPR mobile in pianta

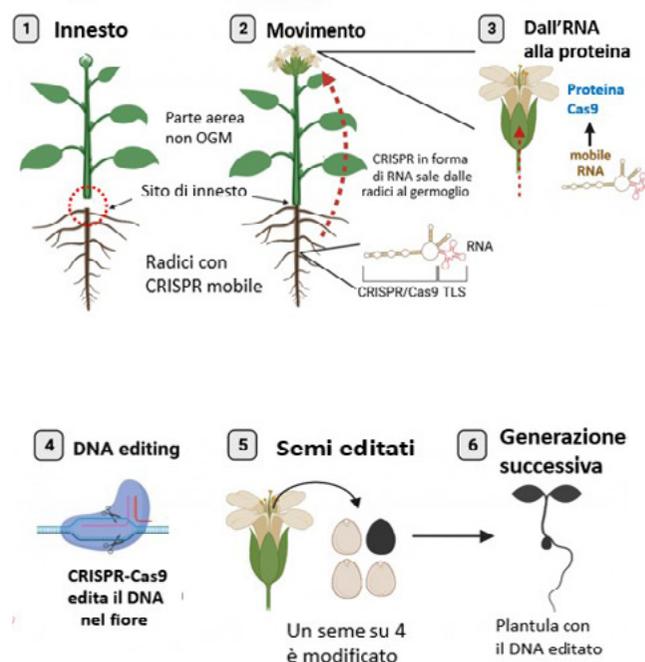


Fig. 1: Editing genomico con grafting e CRISPR mobile in pianta. Infografica adattata da <https://www.Plamorf.eu>

L'idea è venuta a un gruppo di ricercatori tedeschi guidato da Friedrich Kragler, lavorando nella cornice del progetto europeo Plamorf che studia i segnali che viaggiano nel sistema vascolare delle piante. Le foglie, ad esempio, devono essere informate di ciò che accade alle radici e viceversa, perciò c'è un via vai di messaggi sotto forma di RNA lungo lo stelo. Per far viaggiare in questo modo le forbici genetiche facendole arrivare alle gemme che daranno origine ai fiori, basta usare CRISPR sotto forma di RNA e legare a questo trascritto una sequenza di trasporto (TLS). In questo modo il pacchetto genetico per il sistema CRISPR presente nel portainnesto produce una variante mobile di CRISPR. Questo RNA salirà lungo lo stelo e una volta giunto a destinazione verrà tradotto nel complesso proteico corrispondente, ovvero le forbici genetiche pronte a tagliare il bersaglio per cui sono state programmate. Sia l'RNA che le proteine vengono rapidamente degradate nelle cellule, quindi dopo aver esaurito il loro compito non resteranno in circolazione. La correzione genetica avverrà nelle cellule madri di polline e cellule uovo e, grazie all'autoimpollinazione, un quarto dei semi la riceverà in doppia copia.

Anche se la pianta parentale è parzialmente OGM (perché il portainnesto contiene il gene per le forbici genetiche), le piante figlie non hanno bisogno di innesti e non contengono geni estranei, solo la mutazione desiderata che avrebbe potuto generarsi spontaneamente in natura.

Kragler e colleghi hanno effettuato l'esperimento usando come portainnesto la pianta modello *Arabidopsis thaliana* e il sistema ha funzionato anche quando la parte innestata apparteneva a una specie diversa (*Brassica rapa*). Il loro studio è stato pubblicato su *Nature Biotechnology* nel gennaio 2023.

Abbiamo chiesto a Riccardo Velasco, direttore del Centro di Ricerca in Viticoltura ed Enologia del Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia (CREA), di spiegarci le altre opzioni disponibili per produrre piante editate OGM-free. Il quadro che ci ha aiutato a ricostruire è complesso. Supponiamo di riuscire a introdurre il sistema CRISPR in una singola cellula di partenza sotto forma di DNA, con l'aiuto di un batterio vettore (*Agrobacterium tumefaciens*).

“Il problema è che ci sono varietà recalcitranti, per cui è molto difficile rigenerare un'intera pianta dalla cellula editata” - spiega il genetista vegetale. Poi per eliminare la cassetta genetica, lasciando solo la mutazione desiderata senza DNA extra, si seguono strade diverse a seconda della pianta. Se è una specie annuale (con linee pure) il 25% delle piante editate è privo di transgeni, quindi si può procedere all'autoimpollinazione. Se la specie editata con l'aiuto dell'agrobatterio è pluriennale, invece, si può ricorrere a un passaggio biotech che sfrutta il calore per espellere il DNA estraneo.

“L'alternativa è fornire CRISPR/Cas9 sotto forma di complesso proteico con la sua RNA guida in un passaggio delicato usando prodotti a protezione della cellula in coltura, così si evita lo step della rimozione del DNA estraneo” - aggiunge Velasco. Restano però il problema della coltura tissutale che allunga i tempi e complica il cammino, soprattutto per le specie resistenti a trasformazione genetica e rigenerazione, tra cui le piante leguminose come la soia e la maggioranza degli alberi da frutto.

In alcuni casi non basta spegnere un gene indesiderato con l'editing, ma è necessario inserire un gene utile proveniente da una varietà sessualmente com-

patibile (si parla di cisgenesi, anziché di transgenesi, se il gene avrebbe potuto essere trasferito mediante incrocio). Con un processo biotech e l'aiuto del calore è possibile rimuovere le sequenze indesiderate della cassetta genica lasciando il gene desiderato, che avrebbe potuto essere introdotto anche con metodi convenzionali.

“L'escissione delle sequenze lascia tracce minime, del tutto simili a fenomeni naturali, perciò non avrebbe senso considerare queste piante alla stregua di quelle transgeniche” - sostiene Velasco.

L'editing by grafting con CRISPR mobile è un'ingegnosa novità che arricchisce la cassetta degli strumenti dei breeder. Dovrà essere perfezionato per quanto riguarda l'efficienza ma sono fiduciosa che funzionerà

ci ha detto Rosa Rao, che all'Università di Napoli usa il grafting proprio per studiare come viaggiano i segnali da una parte all'altra delle piante, ad esempio quando il pomodoro è attaccato da microrganismi patogeni.

La regina cinese delle agrobiotecnologie Caixia Gao, che ha firmato insieme a Jiacheng Hu il pezzo di commento su Nature Biotechnology, ritiene che l'approccio sarà facilmente applicabile alle piante compatibili con innesti di Arabidopsis, come pomodoro e rapa. Altre piante come frumento e riso, però, non hanno ancora protocolli di innesto ben stabiliti.

“Al CREA vorremmo mettere alla prova l'idea con

specie e varietà per cui è particolarmente difficile fare trasformazione e coltura in vitro. Abbiamo un progetto che potrebbe coinvolgere le unità olivicoltura e frutticoltura oltre che viticoltura. Se riuscissimo in piante come pesco e olivo sarebbe un risultato straordinario” - conclude Velasco.